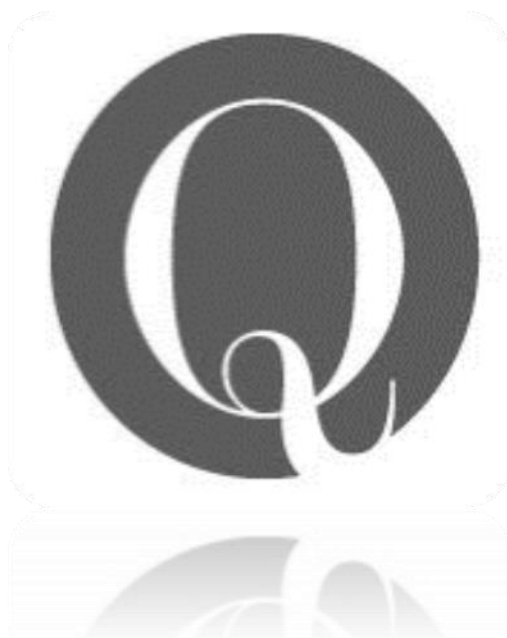


Universidad Nacional de Quilmes



“Fosfohidrolasas aplicadas en biocatálisis y biorremediación”

Lic. Santillan Julia Yamila

Director de tesis

Dr. Adolfo Iribarren

2019

El presente trabajo de Tesis Doctoral, para optar por el grado de Doctora en Ciencia y Tecnología de la Universidad Nacional de Quilmes, ha sido realizado en el Laboratorio de Biotransformaciones del Departamento de Ciencia y Tecnología de dicha Universidad, bajo la dirección del Dr. Adolfo M. Iribarren.

A mi abuela Miguelina.

A mis padres.

AGRADECIMIENTOS

A lo largo de este trabajo he leído diferentes tesis y una de ellas decía que si bien esta sección es la última que se suele escribir, es lo primero que se lee cuando llega a nuestras manos, y permite intuir el esfuerzo invertido. Creo que también muestra que detrás del autor hay muchas personas que lo han ayudado, acompañado y alentado a recorrer este camino. Particularmente, me siento afortunada de todas esas personas que me han rodeado en estos años y han sido pilares para que hoy haya llegado hasta donde llegué, haciendo y disfrutando lo que me encanta. Es por ello que quiero aprovechar esta oportunidad para agradecerles y hacerles saber lo importante que han sido, y son en este recorrido.

En primer lugar quisiera agradecerle al Dr. Adolfo Iribarren por haberme dado la oportunidad de trabajar en este hermoso grupo de investigación que lleva al frente, por permitirme hacer esta tesis bajo su dirección, por su paciencia (sobre todo estos últimos tiempos), por sus “costo-beneficio”, “una de cal y una de arena” frases que muchas veces me hicieron parar, pensar y retomar, por brindarme tu conocimiento que sin dudas me ayudaron a crecer en lo académico. Pero más allá de ello quiero resaltar lo personal, siempre ha estado dispuesto a una conversación, un mensaje o brindarme su ayuda.

Elizabeth ¿Te acordas allá por el 2011? Yo aún era estudiante de grado y me encontraba intentando descubrir que rama de la biotecnología era “lo mío”, comencé a cursar “Biocatalizadores en la industria” y en poco tiempo me dije esto quiero hacer! Me abriste las puertas del laboratorio y me permitiste aprender, crecer y hacer lo que me encanta. Gracias por siempre estar dispuesta a ayudarme, a responder mis dudas, y por tu buena onda en el laboratorio y en los congresos.

A Luis, por su predisposición para orientarme y ayudarme en mis inquietudes.

A la Universidad Nacional de Quilmes, por haber sido mi segunda casa, por haberme permitido ser la primera generación universitaria de mi familia y por aún darme herramientas para crecer científica y académicamente, como así también en lo humano.

Al Laboratorio de micología de los alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes, por facilitarme su cepario fúngico, sin el cual parte de esta tesis no se hubiese podido realizar.

Al Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular, Área Virosis de Insectos de la Universidad Nacional de Quilmes por la colaboración para llevar a cabo la identificación de los microorganismos aislados de suelo.

A la Dra. Lorena Rojas, por su buenísima onda y su predisposición para responder mis consultas, por su apoyo y consejos.

A Bruno, por su excelentísima buena onda de siempre, por siempre salvarnos “las papas del fuego” y alcanzarnos o conseguírnos los reactivos que necesitamos para desarrollar los experimentos del día a día.

Quiero agradecer a ese grupito que por el 2011 me supo recibir. Lucas! Desde el día uno, me recibiste y me explicaste todo desde lo más simple hasta lo más complicado con esa mezcla de fanatismo, amor y locura que era lo más. Gracias por bancarme emocionada e intensa, con ganas de hacer todo, de ir todo el tiempo al labo y hacer miles de preguntas! Por contagiarme algunos tocs que aún conservo “alcohol 70% y manos libres de bichos” Pao, Bele, Juli “las nube blanca” también me recibieron super y estuvieron dispuestas a ayudarme en lo laboral, pero más aún en lo personal. Por suerte los consejos, los mates, las charlas trascendieron el laboratorio y seguimos cerca.

También necesito y quiero decirles un gracias gigante (debo decirles que ya se me están cayendo algunas lágrimas) a este grupo que fuimos y somos. Uno grupo unido y con buena onda, que siempre tratamos de ayudarnos y complementarnos. Gracias por tantas risas, por las anécdotas compartidas en el labo y en los congresos. Sin duda estos años han hecho que lo laboral se haga sencillo y divertido.

Estefi, nos conocimos hace unos años, siendo tu instructora en Química I, pero creo que tu impresión sobre mi mejoró en la convivencia laboral. Gracias por los mates y charlas, por el día a día compartido.

Andy, tengo que agradecerte por confiar en mi para co-dirigir tu tesina de grado, pero muchísimo más por bancarme un poco exigente y bastante intensa, por permitirme aprender de vos, por venir con ideas nuevas y abrirme la mente a lo largo, un poco de esta tesis también es tuya.

Romi, aliada en el tema del orden y la limpieza, gracias por las charlas, los mates y los momentos “minita” compartidos.

Mati, un gracias grande por las charlas, los cafés y siempre tú buena energía compartida, por incentivar me siempre y por hacerme ver que puedo dar más.

Seba, amigo querido gracias por compartir todo tu conocimiento en cultura general, por tus discusiones aburridas (para mí) de política con Toti y por tus infaltables mates, por tu buena onda siempre y por tus momentos aislado del mundo, por tus chistontos! Sos una gran

persona, admiro tu bondad y tu desinterés. Espero que en este tiempo haya podido absorber un poco de ello, como así también que esta amistad siga creciendo.

Toti, mi besti! Amigo, tengo una infinidad de cosas por decir y agradecerte. Primero y más importante, gracias por bancarme en mis momentos más insoportables, pero también en los más felices. Gracias por tener ese no sé qué para decir las cosas (las buenas y las malas), siempre tenes la palabra justa para dejarme reflexionando. Gracias por mirar más allá de lo que uno muestra, gracias por las miles de charlas, por los mates, por tu buena energía, por tu alegría. Gracias por tu amistad, que sin dudas es una de las cosas más hermosas que me llevo y quiero conservar.

Además de esas lindas personas, la universidad a lo largo de mi carrera de grado me dejó grandes amigos...amigos con los que compartí el curso de ingreso y desde entonces caminamos a la par, y otros con los que me crucé en el camino. Ani, Estefi, Noe, Li, Seba, Facu, Marce, Negra...amigos ¿Que decirles? Los amo y soy feliz de tenerlos en mi camino, de que estén en mi vida. Supieron compartir mis pequeños logros y ser felices por ellos, y también estuvieron ahí para bancar los momentos no tan felices. Gracias por estar en mi vida.

Facu, amigo gracias por compartir tantas noches de fiesta y estar firme cuando necesite una palabra. Gracias por demostrarme, pese a tu seriedad que puede contar con vos.

Sebita ¿te acordas de esos mates en la biblioteca los sábados? gracias por hacerme reír tanto siempre, por ser colgado pero por estar siempre firme en lo importante!

Li, Gracias por tu simpleza, por tu sencillez y buena onda siempre! Siempre me transmitís una energía hermosa!, gracias por hacerme tía de una bombona, las amo!

Noe, amiga cuantos años compartidos no? Se me viene a la cabeza aquella aula del ingreso, te sentabas adelante a la izquierda super charlatana (muy raro en vos) esa primera impresión no fue errada. Gracias siempre tus historias con todos, todos, todos los detalles son lo más! Gracias por estar presente siempre, Te quiero tannnnnnntooo amiga!

Estefi, hermosa de la vida lo que te amo y lo feliz que soy al ser tía de un bombonazo como lo es Marloncito, es increíble. Gracias por tu simpleza, por tus palabras, por los findes maratónicos de fiesta 2009, por estar aunque pasen días sin hablarnos, por todo el cariño que me brindas y demostrás.

Ani, amiga mía después de unos 12 años compartiendo nuestras vidas ¿Qué te puedo decir? Tantas horas de estudio, de pasillo y biblioteca, de mensajes de texto a las 2 de la mañana para no quedarnos dormidas si teníamos que estudiar, de salidas, mates, tardes, charlas risas y algunas lágrimas...es tanto lo compartido que hoy me encuentro siendo madrina de tu hija, a

la que amo! Gracias por la confianza mutua, por poder decirnos las cosas buenas y malas, y con nuestros caracteres sobrevivir a ello! Te amo a vos y a Isa!

Marce, loca capricorniana!! Amiga querida nos cruzamos en un momento de nuestras vidas que creo, fue el justo. Tantos momentos vividos (sobre todo noches de fiesta), tantas etapas que fuimos pasando y superando, bancándonos una a la otra. Gracias sobre todo por este último mes de paciencia inagotable con el temita “Tesis” junto a la Negra. Lo que las quiero es infinito!

Negrita, Bel! No sé bien como terminamos siendo este grupito de 3, pero también quiero agradecerte por dejarme conocerte, por tu simpleza, por hacerme reír siempre, por cada finde venirte a compartir con las pibas una cena o un “la roca”.

Gracias a cada uno de estos amigos, que son la familia que elijo! Sin dudas este camino no sería lo mismo sin ustedes.

Ya casi finalizando les quiero agradecer a mi familia. No sería quien soy, ni estaría en este lugar, si no fuera por ellos! Los amo infinitamente.

Maxi, hermanito mío. Desde que eras un bebé me propuse cuidarte y estar a tu lado siempre. Gracias por ser siempre el que tiene buena onda, el que tira para adelante buscándole lo bueno a todo, te amo más que a todo!

Papi, no me voy a olvidar nunca cuando me dijiste “vos estudia, yo te banco”, y acá estoy! Sin tu apoyo no hubiese llegado a donde estoy. Gracias por dejar en mí, eso de ser laburadora, de ingeniártelas para hacer hasta la cosa más tonta. Gracias por siempre darnos todo lo que estuvo a tu alcance para vernos crecer, y a tu modo demostrarme tu cariño.

Mami ¿y a vos? Tengo mucho para agradecer, pero lo principal es por enseñarme a ser una luchadora por lograr sus objetivos y no parar hasta llegar a donde uno quiere, por siempre incentivarme a estudiar a aprender cosas nuevas. Por contagiarme la locura por la música, por ser compañeras de recitales, por estar siempre pendiente de mí, por ser mi mamá.

Alan, no hay un gracias tan grande como el que quisiera decir... gracias por bancarte a esta loca que soy. Por tratar de entender un poco de qué se trata este mundo de becas, doctorado y conicet, gracias por bancarme en este camino que elegí. Gracias por esa libertad que nos caracteriza y que tanto amo. Gracias. Te amo.

Y por último, a *Rubí y Axel*, mis hijos felinos que me dan muchísimo amor y han estado cerca de mí, días y noches de escritura.

RESUMEN

Las fosfotriesterasas son esterasas capaces de escindir el enlace P-O y han sido halladas en mamíferos, peces, aves, moluscos y bacterias. Estas enzimas demostraron ser biocatalizadores útiles en la degradación de compuestos organofosforados, siendo estos ampliamente utilizados en la actualidad como pesticidas en agricultura, en jardines y en la industria veterinaria. En particular, en nuestro país el organofosforado clorpirifós es el segundo pesticida más utilizado. Si bien estos pesticidas son muy eficientes, son también altamente tóxicos para mamíferos. Así, la intoxicación por organofosforados se ha convertido en un problema importante en todo el mundo.

Considerando lo antes dicho, en el presente trabajo de tesis doctoral se propuso como primer objetivo el desarrollo de un sistema para la biorremediación de aguas contaminadas con pesticidas organofosforados empleando catalizadores con actividad fosfotriesterasa.

Por otra parte y desde el punto de vista de la biocatálisis, como las enzimas no están limitadas a su actividad natural, es posible utilizarlas empleando una variedad de sustratos, pudiendo además catalizar las reacciones en ambas direcciones de su equilibrio termodinámico. Es por ello que las fosfotriesterasas pueden ser aplicadas en el sentido sintético para la obtención de fosfotriesteres, siendo de particular importancia los correspondientes derivados de nucleósidos y análogos. Estos compuestos, conocidos como pronucleótidos, son productos farmacológicamente útiles como antivirales y anticancerígenos ya que inhiben enzimas específicas (transcriptasa reversa, ARN replicasa, ADN polimerasa, IMP deshidrogenasa) o actúan como terminadores de cadena en la biosíntesis de ARN o ADN. En este marco, se propuso como segundo objetivo efectuar una primer aproximación a la síntesis de pronucleótidos a través de reacciones biocatalizadas.

A continuación se hará un breve resumen de lo desarrollado a lo largo de cada capítulo del presente trabajo de tesis doctoral:

En el *capítulo 1*, se presenta una introducción sobre biocatálisis y biorremediación. Ambas tecnologías tienen en común el empleo de sistemas biológicos para llevar a cabo una biotransformación. En este marco también se describen las fosfotriesterasas, enzimas de interés y objeto de estudio del presente trabajo, como así también los compuestos organofosforados (usos y tipos) y los análogos de nucleósidos.

En el *capítulo 2*, se describen las metodologías desarrolladas para llevar a cabo la búsqueda, estudio e implementación en los procesos biocatalíticos de fuentes microbianas con actividad fosfotriesterásica. Adicionalmente, se detallan los métodos de detección, análisis y cuantificación de los sustratos y productos de cada reacción biocatalizada estudiada.

En el *capítulo 3*, se exponen los resultados obtenidos a partir del estudio de la actividad hidrolítica de seis fuentes bacterianas *wild type* frente a metil paraoxón. También se muestran los resultados de la optimización de las condiciones de reacción de dichos biocatalizadores, a partir de las cuales se evaluó la actividad fosfotriesterásica frente a diferentes sustratos, seleccionando un biocatalizador capaz de degradar cada uno de los compuestos organofosforados propuestos.

En el *capítulo 4*, se presenta un trabajo realizado en colaboración con el laboratorio de LIGBCM-AVI de la Universidad Nacional de Quilmes que permitió la identificación de dos bacterias aisladas de suelo. Posteriormente, aplicando una metodología rápida y sencilla, se describe el estudio y la optimización de las condiciones de reacción, obteniéndose biocatalizadores capaces de degradar eficientemente sustratos más voluminosos como coroxón, cumafós y clorpirifós, para los que las fosfotriesterasas *wild type* reportadas suelen tener baja actividad hidrolítica.

En el *capítulo 5*, se presentan los resultados del estudio de los extractos enzimáticos provenientes de los microorganismos estudiados en los capítulos 3 y 4. Adicionalmente tanto las células enteras como dichos extractos fueron inmovilizados por atrapamiento en perlas de alginato de calcio. Tras su ensayo en la hidrólisis de compuestos organofosforados, se seleccionó una forma de biocatalizador inmovilizado que fuera capaz de degradar con mayor eficiencia cada uno de dichos compuestos.

Asimismo, se emplearon los biocatalizadores seleccionados para la degradación de paraoxón y clorpirifós en un biorreactor del tipo lecho empacado con los que se alcanzó la degradación completa de dichos compuestos en 56 y 17 h respectivamente. Se caracterizaron los biocatalizadores determinando la posible existencia de problemas de transferencia de masa, como así también su reutilización. En cuanto al biorreactor, se determinó la distribución de los tiempos de residencia y tipo de flujo.

En el *capítulo 6*, con la finalidad de hallar nuevas fuentes de fosfotriesterasas, se presenta el estudio de cuatro hongos, los que fueron capaces de degradar metil paraoxón llevando a cabo la reacción en *growing*. Además, se determinó que las enzimas responsables de dicha

hidrólisis eran extracelulares, por lo que se obtuvieron los respectivos extractos enzimáticos, que se concentraron y finalmente liofilizaron, analizándose su actividad. Se optimizaron también las condiciones de reacción en cuanto a la cantidad de biocatalizador y pH del medio.

Finalmente, en el *capítulo 7*, se describe la búsqueda de alternativas para mejorar los rendimientos obtenidos previamente en nuestro laboratorio en la reacción de transesterificación para la síntesis de 5'-dimetilfosfato de inosina usando como biocatalizador la fosfotriesterasa de *Brevundimonas diminuta*. Se exploró la actividad sintética de *Streptomyces setonii* (microorganismo *wild type*) y de los microorganismos fúngicos estudiados en el capítulo 6, utilizando las condiciones puestas a punto en la reacción de hidrólisis.

ABREVIATURAS

ACh	Acetilcolina
AChE	Acetilcolinesterasa
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ANS	Análogo de nucleosido
ARN	Ácido ribonucleico
ASN	<i>Aspergillus niger</i>
Bsp	<i>Brevundimonas sp</i>
C13	<i>Streptomyces phaeochromogenes</i> CCRC 10811
C35	<i>Streptomyces setonii</i> ATCC 39116
C39	<i>Nocardia corynebacterioides</i> ATCC 14898
C49	<i>Nocardia asteroides</i> ATCC 19296
C55	<i>Arthrobacter oxydans</i> ATCC 14358
C64	<i>Arthrobacter oxydans</i> ATCC 14359
CC	Curva de calibración
CE	Crudo enzimático
CECT	Colección Española de Cultivos Tipo
CO	Coroxón
CP	Cumafós
CPP	Clorpirifós
DDVP	Diclorvos
DEP	Dietil fosfato
DMP	Dimetil fosfato
DMSO	Dimetilsulfóxido
EE	Extracto enzimático
EPA	Environmental Protection Agency
FSP	<i>Fusarium sp</i>
IARC	International Agency for Research on Cancer
IEP	Índice de exposición a pesticida
IIAT	Índice de impacto ambiental total
Km'	Constante Michaeliana aparente

MP	Metil paratión
MPO	Metil paraoxón
ND	No determinado
OMS	Organización Mundial de la Salud
ON	<i>Overnight</i>
OP hidrolasa	Organofósforo hidrolasa
OPs	Compuestos organofosforados
Pd	<i>Pedobacter</i>
PENCH	<i>Penicillium chrysogenum</i>
PENNL	<i>Penicillium nalgiovence</i>
PNF	<i>p</i> -nitrofenol
PO	Paraoxón
PTE	Fosfotriesterasa
TCP	Tricloro piridinol
t_R	Tiempo de retención
Wt	<i>Wild type</i>
λ_{em}	Longitud de onda máxima de emisión
λ_{ex}	Longitud de onda máxima de excitación

ÍNDICE

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	25
1.1 BIOCATÁLISIS, BIOTRANSFORMACIONES Y BIOCATALIZADORES	27
1.1.1. <i>Generalidades</i>	27
1.1.1.1. Ventajas	27
1.1.1.2. Desventajas	28
1.1.2. <i>Proceso biocatalítico</i>	29
1.1.2.1. Biocatalizador	29
1.1.2.2. Inmovilización	31
1.1.2.2.1. Efecto en la estabilidad	33
1.1.2.2.2. Efecto en la actividad	34
1.1.2.3. Selección del método de inmovilización	35
1.1.3. <i>Biorreactores</i>	36
1.1.3.1. Tipos de biorreactores	36
1.1.3.2. Selección y caracterización de la operación de los biorreactores	38
1.2. BIORREMEDIACIÓN	40
1.2.1. <i>Generalidades</i>	40
1.2.1.1. Ventajas	41
1.2.1.2. Desventajas	41
1.3. COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS	43
1.3.1. <i>Generalidades</i>	43
1.3.2. <i>Uso de plaguicidas y su problemática en Argentina</i>	51
1.4. FOSFOTRIESTERASAS	56
1.5. NUCLEÓSIDOS NATURALES Y SUS ANÁLOGOS	59
1.5.1. <i>Aplicaciones</i>	61
1.5.1.1. Anticancerígenos	61
1.5.1.2. Antivirales	63
1.5.1.3. Pronucleótidos	65
BIBLIOGRAFÍA	67

CAPÍTULO 2. MATERIALES Y MÉTODOS	81
2.1. REACTIVOS Y MICROORGANISMOS	83
2.2. SÍNTESIS QUÍMICA DE MPO Y CO	83
2.3. ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE FOSFOTRIESTERASAS BACTERIANAS	83
2.3.1. <i>Cultivo bacteriano</i>	83
2.3.2. <i>Preparación de biocatalizadores</i>	84
2.3.2.1. Célula entera	84
2.3.2.2. Extracto enzimático	84
2.3.3. <i>Determinación de la actividad hidrolítica</i>	85
2.3.3.1. Condiciones estándar	85
2.3.3.2. Condiciones variables	85
2.3.3.2.1. pH y temperatura	85
2.3.3.2.2. Sustrato	85
2.3.4. <i>Inmovilización de célula entera y extracto enzimático; y su evaluación como biocatalizador en la hidrólisis de OPs</i>	86
2.3.4.1. Inmovilización	86
2.3.4.2. Evaluación de lo biocatalizadores inmovilizados en la degradación de OPs	86
2.3.4.3. Optimización de la carga enzimática del biocatalizador inmovilizado	87
2.3.5. <i>Diseño de reactor para el tratamiento de aguas contaminadas con OPs</i>	87
2.3.5.1. Caracterización del reactor	88
2.4. ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE FOSFOTRIESTERASAS FÚNGICAS	90
2.4.1. <i>Cultivos fúngicos</i>	90
2.4.2. <i>Determinación de la actividad hidrolítica fúngica</i>	91
2.4.3. <i>Aislamiento de PTE fúngica extracelular</i>	91
2.4.3.1. Determinación de proteínas totales del extracto enzimático	92
2.4.3.2. Determinación de la actividad hidrolítica del extracto enzimático	92
2.5. AISLAMIENTO DE NUEVAS FUENTES FOSFOTRIESTERÁSICAS DE SUELO	92
2.5.1. Identificación de especies bacterianas a nivel de género de dos cultivos bacterianos mediante análisis del 16S rDNA	93
2.5.1.1. Extracción del ADN total	93

2.5.1.2. Amplificación	93
2.5.1.3. Electroforesis en gel de agarosa	93
2.5.1.4. Purificación de productos y secuenciación	94
2.5.1.5. Análisis bioinformático	94
2.5.2. <i>Determinación de la actividad fosfotriesterásica y puesta a punto de las condiciones de reacción de los microorganismos aislados</i>	94
2.6. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA	95
2.6.1. <i>MPO, PO, MP</i>	95
2.6.2. <i>CO, CP</i>	96
2.6.3. <i>CPP</i>	96
2.6.4. <i>DDVP</i>	97
2.6.5. <i>Análisis estadístico</i>	97
2.7. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE 5-DIMETILFOSFATO DE INOSINA	98
2.7.1. <i>Preparación del biocatalizador</i>	98
2.7.2. <i>Reacción de transesterificación</i>	98
2.7.3. <i>Análisis de muestras y cuantificación del producto de interés</i>	99
BIBLIOGRAFÍA	101
 CAPÍTULO 3. ESTUDIO Y OPTIMIZACIÓN DE LAS CONDICIONES DE REACCIÓN DE NUEVAS FUENTES BACTERIANAS CON ACTIVIDAD FOSFOTRIESTERASA	 105
OBJETIVOS	107
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	111
3.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE MPO Y CO	113
3.2. HIDRÓLISIS DE COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS POR FOSFOTRIESTERASAS BACTERIANAS	113
3.2.1. Reacción de hidrólisis en condiciones estándar	113
3.2.2. Estudio de la actividad fosfotriesterásica en condiciones de reacción variables	116
3.2.2.1. pH y temperatura	116
3.2.2.2. Sustrato	119
3.2.2.2.1. MPO, PO y MP	119
3.2.2.2.2. CO y CP	122
3.2.2.2.3. DVVP	125

3.2.2.2.4. CPP	126
CONCLUSIONES	129
BIBLIOGRAFÍA	133
 CAPÍTULO 4. IDENTIFICACIÓN DE BACTERIAS AISLADAS DE SUELO Y ESTUDIO DE SUS ACTIVIDADES FOSFOTRIESTERASA	 137
OBJETIVOS	139
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	143
4.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD FOSFOTRIESTERASA	145
4.1.1. Identificación de los aislamientos	145
4.1.1.1. Amplificación del 16S <i>r</i> DNA	145
4.1.1.2. Secuencias depuradas y corregidas	146
4.1.1.3. Identificación por comparación con Ribosomal Database Project y Silva database	147
4.2. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE <i>PEDOBACTER</i> Y <i>BREVUNDIMONAS SP</i>	150
4.2.1. Reacción de hidrólisis en condiciones estándar	150
4.2.2. Determinación de las condiciones de reacción	151
4.2.2.1. pH y temperatura	151
4.2.2.2. Sustrato	155
CONCLUSIONES.....	159
BIBLIOGRAFÍA	163
 CAPÍTULO 5. ESTUDIOS TENDIENTES A LA APLICACIÓN EN BIORREMEDIACIÓN DE LOS BIOCATALIZADORES ESTUDIADOS. DESARROLLO DE UN BIORREACTOR	 167
OBJETIVOS	169
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	173
6.1. INFLUENCIA DE LA FORMA DE BIOCATALIZADOR EN LA ACTIVIDAD PTE	175
6.1.1. <i>Célula entera vs extracto enzimático</i>	175
6.1.2. <i>Biocatalizador libre vs inmovilizado</i>	177
6.1.3. <i>Optimización de la carga enzimática del inmovilizado</i>	179
6.2. DISEÑO DE UN BIORREACTOR PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS	180

CONTAMINADAS CON PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS	
6.2.1. Condiciones de operación del sistema	181
6.2.1.1. Temperatura	181
6.2.1.2. Biocatalizadores	182
6.2.1.2.1. Selección del biocatalizador	182
6.2.1.2.2. Estudio de transferencia de materia a través del biocatalizador inmovilizado	183
6.2.2. Detección y seguimiento de las reacciones llevadas a cabo en biorreactor	185
6.2.2.1. Paraoxón	185
6.2.2.2. Clorpirifós	185
6.2.3. Caracterización del reactor	187
6.2.3.1. Determinación del tiempo de residencia y tipo de flujo	187
6.2.3.2. Reutilización y productividad	189
CONCLUSIONES	191
BIBLIOGRAFÍA	195
 CAPÍTULO 6. HONGOS, FUENTES DE HIDROLASAS DEGRADADORAS DE MPO	 199
OBJETIVOS	201
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	205
5.1. SCREENING EN MEDIO LÍQUIDO DE PTE FÚNGICAS	207
5.1.1. <i>Evaluación de la actividad PTE fúngica</i>	207
5.1.2. <i>Efecto del pH en la actividad PTE</i>	210
5.2. OBTENCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE UN EXTRACTO ENZIMÁTICO FÚNGICO ACTIVO	211
5.2.1. <i>Obtención del extracto enzimático</i>	211
5.2.1.1. Concentración por precipitación	212
5.2.1.2. Concentración por filtración	212
5.2.2. Optimización de la carga enzimática	214
CONCLUSIONES	217
BIBLIOGRAFÍA	221

CAPÍTULO 7. SÍNTESIS DE DIMETILFOSFATO DE INOSINA	225
OBJETIVOS	227
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	231
7.1. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE 5-DIMETILFOSFATO DE INOSINA	233
7.1.1. Transesterificación biocatalizada por PTE bacterianas	233
7.1.2. Transesterificación biocatalizada por PTE fúngicas	236
CONCLUSIONES	239
BIBLIOGRAFÍA	243
CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS A FUTURO	247
ANEXO	255

CAPÍTULO 1

Introducción

1.1. BIOCATÁLISIS, BIOTRANSFORMACIONES Y BIOCATALIZADORES

1.1.1. Generalidades

Una biotransformación es la conversión de un compuesto químico por acción de un sistema biológico: vegetales, tejidos, microorganismos o enzimas derivadas de ellos. Tanto las biotransformaciones como la catálisis enzimática frecuentemente son referidas como “biocatálisis” y las entidades que las llevan a cabo, “biocatalizadores”. El uso de enzimas, antes de que se conociera su existencia, se remonta miles de años a la fabricación de pan y queso, a la elaboración de cerveza y al vino. El procesamiento de alimentos y bebidas junto con los alimentos para animales y los detergentes todavía representan más del 60% del mercado total de enzimas, el resto consiste principalmente en el procesamiento de almidón, cuero, pulpa y papel, y esto se refleja en las tres enzimas industriales de mayor volumen: proteasas, amilasas e isomerasa de glucosa. Las primeras preparaciones de enzimas comerciales se produjeron a fines del siglo XIX y principios del XX e incluyen el uso de estómagos de terneros secos en la fabricación de queso y extractos pancreáticos en la limpieza de ropa¹. En los últimos años, la biocatálisis ha adquirido un lugar destacado en la química orgánica sintética, y en consecuencia también lo ha sido para la biotecnología ya que tanto la producción de enzimas como de microorganismos necesitan de sus herramientas. Las ventajas que presentan las biotransformaciones por sobre la química orgánica tradicional ha favorecido su desarrollo².

1.1.1.1. Ventajas

- *Las enzimas son biocatalizadores muy eficientes*, son capaces de catalizar quimio, regio y estereoselectivamente las reacciones, y suelen acelerarlas en un factor de 10^8 - 10^{10} , y en algunos casos pueden exceder un factor de 10^{17} .
- *Las enzimas no producen contaminación medioambiental*, la biocatálisis es amigable con el medio ambiente ya que las enzimas son completamente biodegradables, además las biotransformaciones cumplen con los requerimientos de la “química verde”.
- *Las enzimas trabajan en condiciones suaves*, generalmente trabajan en un rango cercano al pH 7 y a temperaturas alrededor de 30°C. Esto minimiza las reacciones no deseadas como

las descomposiciones, isomerizaciones, racemizaciones, etc. Y disminuye la contaminación y los costos de producción

- *Las enzimas son compatibles entre sí*, ya que permiten llevar a cabo reacciones *one pot* en cascada. Así los sistemas multienzimáticos pueden simplificar los procesos, especialmente si el paso de aislamiento de un intermediario inestable es omitido. Este potencial de las enzimas es cada vez más reportado debido al desarrollo de sistemas multienzimáticos, también denominados como “metabolismos artificiales”.

- *Las enzimas no están limitadas a su papel natural*, debido a que han demostrado ser muy flexibles aceptando una gran variedad de sustratos no naturales e incluso hasta funcionando en solventes no acuosos, lo cual puede ser muy beneficioso desde el punto de vista de los procesos biotecnológicos.

- *Las enzimas pueden catalizar un amplio espectro de reacciones*, como la catálisis en general, las enzimas solo pueden acelerar los procesos pero no tienen impacto en el equilibrio termodinámico de una reacción, por lo tanto pueden funcionar en ambas direcciones. En principio sería posible encontrar un biocatalizador para prácticamente todas las reacciones orgánicas.

1.1.1.2. Desventajas

- *Las enzimas provienen de la naturaleza en una sola forma enantiomérica*; por lo que no hay disponibles enzimas que sean imágenes especulares formadas a partir de D-aminoácidos, por ende es imposible invertir la quiralidad de una reacción enzimática por elección del otro enantiomero del biocatalizador, lo cual es posible cuando están involucrados catalizadores químicos quirales. En consecuencia, es necesario recorrer un largo camino en busca de la enzima con la especificidad adecuada.

- *Las enzimas requieren parámetros operativos muy determinados*; si una reacción resulta muy lenta solo se pueden variar los mismos en un rango muy estrecho, ya que temperaturas elevadas, un pH extremo o incluso altas concentraciones salinas pueden desactivar las enzimas. Sin embargo efectos positivos se han reportado por pequeños cambios de temperatura, y sorprendentemente algunas enzimas han demostrado ser extremófilas.

- *Las enzimas despliegan su máxima actividad catalítica en agua;* debido a su alto punto de ebullición y su alto calor de vaporización, el agua no es un solvente adecuado para realizar reacciones orgánicas. Además, la mayoría de los compuestos orgánicos son poco solubles en medios acuosos, por lo tanto realizar reacciones enzimáticas en medios orgánicos es muy beneficioso pero el costo de ello es la disminución de la capacidad catalítica.

- *Las enzimas se unen a sus cofactores naturales;* las enzimas presentan alta selectividad en la unión de sus cofactores naturales, ya sea como fuentes para sus equivalentes redox (como el NAD(P)H) o como fuente de energía (ATP). La mayoría de estos “reactivos biológicos” son altamente costosos para ser usados en cantidades estequiométricas y desafortunadamente en muchos casos no pueden ser remplazados por sustitutos sintéticos.

- *Las enzimas son propensas a fenómenos de inhibición.* Muchas reacciones enzimáticas son susceptibles de sufrir inhibición por sustratos o productos, lo cual causa que la enzima pierda su actividad catalítica a altas concentraciones de sustrato o producto, un factor que limita la eficiencia del proceso. Mientras que la inhibición por sustrato puede ser sorteada favorablemente agregando pequeñas cantidades del sustrato a medida que avanza el tiempo de reacción, la inhibición por producto es más complicada de solucionar, ya que la remoción del producto por métodos físicos es frecuentemente difícil.

1.1.2. Proceso biocatalítico

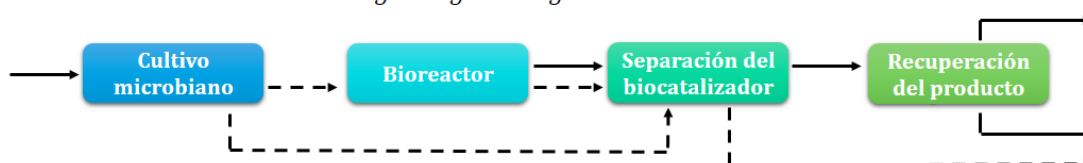
Los procesos biocatalíticos no solo involucran la biotransformación propiamente dicha. Tal como mencionamos es un proceso que consta de la selección y obtención del biocatalizador, la etapa de conversión Y el “*downstream processing*”. Este último proceso involucra los pasos posteriores a la finalización de la reacción a fin de recuperar el producto de interés (Figura 1.1.). La conversión propiamente dicha puede darse inicialmente a escala laboratorio y posteriormente a fin de incrementar la escala, ser realizada en un biorreactor.

Inicialmente analizaremos las diferentes formas de biocatalizador y la selección del más adecuado para la reacción de interés.

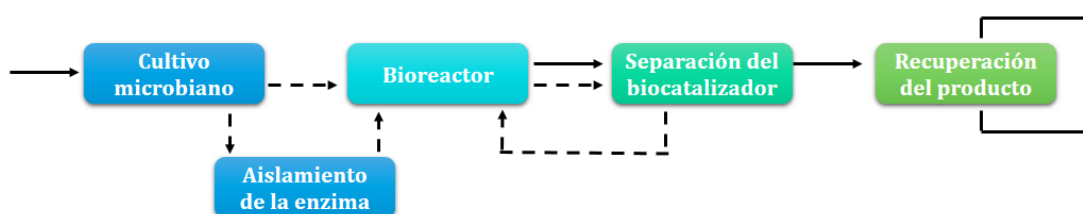
1.1.2.1. Biocatalizador

En la figura 1.1 se esquematizan los posibles procesos biocatalíticos. En el primer caso, la biotransformación con células enteras (Figura 1.1.a) puede llevarse a cabo con células enteras en crecimiento (*growing*) donde el sustrato se utiliza para la producción del biocatalizador así como para la reacción de interés. En este caso la productividad se acopla a la tasa de crecimiento microbiano. También es posible llevar a cabo el crecimiento microbiano y la conversión por separado, lo llamamos células enteras en reposo (*resting*).

a) Biocatálisis con células enteras en *growing* o *resting*



b) Biocatálisis con enzimas aisladas



c) Biocatálisis con biocatalizador inmovilizado

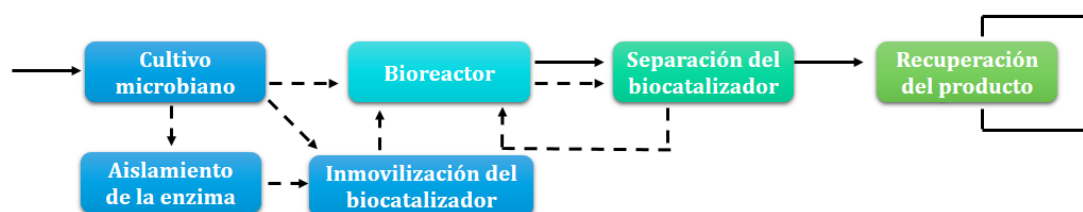


Figura 1.1. Esquema de diferentes procesos biocatalíticos. Las líneas continuas indican las corrientes de sustrato/producto. Las líneas de puntos indican corrientes de biocatalizador.

Al comparar ambas metodologías, la reacción en *resting* ofrece varias ventajas como el uso de medios de reacción alternativos (solventes orgánicos) que facilitan además la recuperación del producto. Asimismo, es posible cambiar la concentración celular después de su cultivo, de esta manera, la productividad de la reacción puede incrementarse considerablemente. Si bien en algunos casos el crecimiento del biocatalizador y su uso, pueden funcionar de manera óptima, el uso de células enteras presenta algunos inconvenientes como la reactividad

cruzada de sustratos o productos que se pueden descomponer a través de reacciones celulares que compiten entre sí, lo que reduce el rendimiento. Del mismo modo, los cofactores no podrían usarse de manera óptima, porque también podrían emplearse en otros lugares de la red metabólica. Finalmente, este tipo de biocatalizador también tiene la desventaja de las posibles limitaciones de difusión del sustrato hacia el interior de las células; cuando se usan sustratos no naturales es posible que no haya mecanismos de transporte activo en la célula, siendo este efecto más marcado en la conversión de sustratos voluminosos.

El segundo grupo, la biocatálisis con enzimas aisladas, se muestra esquemáticamente en la Figura 1.1.b y representa aquellas reacciones en las que la enzima se aísla a partir de las correspondientes células que las producen o bien se emplean enzimas comerciales. Principalmente, este enfoque intenta superar las limitaciones de entrada de sustratos y salida de productos a través de las membranas celulares. En tales casos, la enzima puede obtenerse de manera comercial o a partir de cultivos microbianos, donde la enzima se ha secretado durante el cultivo o las células deben romperse luego (y los restos celulares eliminados), para producir una enzima soluble, aunque no purificada. El uso de una proteína no purificada evita el costo adicional de la purificación, siendo éste el motivo del alto costo de las enzimas comerciales. Una de las principales condiciones para el uso de un catalizador enzimático aislado generalmente es que la enzima se pueda separar fácilmente de la mezcla de reacción. En muchos casos, el costo del biocatalizador es tal que la reutilización es necesaria, y esto se puede lograr de manera más efectiva de acuerdo con el tercer esquema (Figura 1.1.c), utilizando un biocatalizador inmovilizado³.

1.1.2.2. Inmovilización

La inmovilización de un biocatalizador puede definirse como un proceso en el que se lo confina o localiza en una región definida del espacio, para facilitar la separación del medio de reacción mediante una filtración simple permitiendo el reciclado posterior y, por lo tanto, reducir la contribución del costo del biocatalizador al producto final^{3,4}. Los biocatalizadores a inmovilizar pueden ser enzimas, orgánulos, células, etc. Hay dos funciones esenciales que cualquier biocatalizador inmovilizado debe proveer: Las funciones no catalíticas, que proporcionan una separación más fácil y, en consecuencia, la reutilización de los catalizadores y un mejor control del proceso. Estas están conectadas con la naturaleza física y química de la matriz en la que está confinado el biocatalizador; especialmente propiedades geométricas,

forma, tamaño, grosor y longitud. Mientras que las funciones catalíticas, son las que permiten convertir los sustratos en productos deseados y están ligadas a las propiedades catalíticas de la enzima, actividad, selectividad, estabilidad, pH y temperaturas óptimas. Es muy importante diseñar y seleccionar una inmovilización adecuada por la cual los biocatalizadores inmovilizados puedan satisfacer ambas necesidades⁵.

- Ventajas

- a) Incremento de la estabilidad del catalizador inmovilizado
- b) Posible reutilización del derivado, por lo que disminuyen los costos del proceso.
- c) La posibilidad de diseñar un reactor enzimático de fácil manejo y control, adaptado a la aplicación del catalizador inmovilizado.

- Desventajas

- a) Durante el proceso de inmovilización es posible alterar la conformación de la enzima respecto de su estado nativo.
- b) La gran heterogeneidad del sistema biocatalizador-soporte donde pueden existir distintas fracciones de biocatalizador inmovilizado con un diferente número de uniones al soporte.
- c) Siempre suele haber una pérdida de actividad enzimática durante la inmovilización.
- d) El biocatalizador inmovilizado es más caro que el biocatalizador libre.

La inmovilización puede llevarse a cabo por diferentes métodos, los que se clasifican como: métodos por retención química y retención física. El primero incluye adsorción y unión covalente, mientras que el segundo agrupa la inmovilización por atrapamiento y la microencapsulación. En la siguiente tabla se detallan las ventajas y desventajas de dichas metodologías^{6,7}:

Método de inmovilización		Ventajas	Desventajas
RETENCIÓN QUÍMICA	Adsorción	-Sencillo y barato -Alta actividad catalítica -Ningún cambio conformacional de la biocatalizador -No es necesario utilizar reactivos. -Reutilización de material caro.	-Baja estabilidad -Posible pérdida del biocatalizador. Las uniones débiles con el soporte pueden causar desorción del mismo.
	Unión covalente	-Unión fuerte -Alta estabilidad al efecto térmico, del pH y solvente orgánico -Fácil acceso del sustrato a la enzima -Previene la elución de biocatalizadores. -Flexibilidad en el diseño de material y método de soporte.	- El proceso de inmovilización puede alterar la estructura del centro activo -La enzima posee una movilidad limitada, lo que causa una disminución en la actividad -Menos efectivo para la inmovilización de células -Los soportes no son renovables.
RETENCIÓN FÍSICA	Atrapamiento	-Protección del biocatalizador -Permite el transporte de compuestos de bajo peso molecular. -Permite la operación continua debido a la densidad celular mantenida. -Facilita la separación de células y simplifica el proceso posterior.	- Limitaciones en la transferencia masa -Baja carga de biocatalizador
	Microencapsulación	-Proporciona la gran área de superficie entre el material polimérico y la enzima. -Es posible encapsular simultáneamente una gran variedad de biocatalizadores, llevándose a cabo reacciones que ocurren en múltiples pasos.	-Inactivación de la enzima durante la encapsulación

Tabla 1.1. Ventajas y desventajas de los métodos de inmovilización⁶.

1.1.2.2.1. Efectos de la inmovilización en la estabilidad

Generalmente se observa un incremento en la estabilidad de las enzimas después de su inmovilización, que se debe principalmente a las siguientes razones:

- Una estabilización conformacional de la enzima debido a la existencia de uniones multipuntuales enzima-soporte. La estructura terciaria de la enzima adquiere una mayor

rigidez y se hace más resistente a la desactivación térmica o química. Este tipo de estabilización se obtiene únicamente llevando a cabo la inmovilización por unión covalente.

- Se evita la agregación intermolecular al mantener las moléculas de enzima retenidas en una determinada región del espacio.
- Existe una alteración del microentorno del biocatalizador debida a la interacción del biocatalizador con el soporte. Por ejemplo, el soporte tiene un efecto tamponador de tal manera que mantiene el pH óptimo de la enzima en su microentorno, aunque en la disolución se produzcan cambios importantes de pH. Por otra parte, en aquellas reacciones catalizadas por enzimas inmovilizadas en presencia de disolventes orgánicos, la “acuofilia” del soporte o su capacidad para retener agua, regula la actividad de la enzima. Cuanto mayor es la acuofilia del soporte, más agua adsorbe y la enzima poseerá la cantidad necesaria de agua en su microentorno para mantener su conformación activa, favoreciendo así la estabilidad de la misma.

1.1.2.2.2. Efectos de la inmovilización en la actividad enzimática

Tras una inmovilización, la actividad de la enzima puede disminuir e incluso perderse por diversas razones. Si pierde totalmente la actividad enzimática puede ser debido a que:

- La unión al soporte se produce de tal forma que el paso del sustrato al centro activo está impedido.
- Los grupos reactivos del soporte reaccionan con algún aminoácido que forme parte del centro activo o que sea esencial para la actividad catalítica de la enzima.
- La inmovilización puede originar un cambio conformacional que da lugar a una forma inactiva.
- Las condiciones experimentales del proceso causan la desnaturalización o desactivación de la enzima.

Si la pérdida de actividad no es total después de la inmovilización, los cambios se deberán principalmente a los siguientes efectos:

- *Efectos difusionales:* Como consecuencia de la inmovilización, la difusión de los sustratos hacia el centro activo de la enzima puede estar impedida por resistencias de tipo externo e interno. Si el soporte es insoluble en el medio de reacción, la resistencia del tipo externa estará dada debido a que el sustrato deberá atravesar la película líquida estacionaria (capa de Nernst o de difusión) que rodea el soporte. En las proximidades de un soporte no cargado, la concentración de sustrato es menor que en el resto de la disolución, puesto que existe un gradiente de concentración a través de la zona de difusión. Por tanto, los valores de K_m para las enzimas inmovilizadas son siempre aparentes (K_m'). Por su parte las resistencias difusionales internas, se deben a que los sustratos tienen que atravesar el interior del gel, microcápsula, fibra o poro del soporte donde se encuentra la enzima inmovilizada.

Existen diversas maneras de minimizar estos efectos difusionales como por ejemplo: disminuir el tamaño del biocatalizador, aumentar la concentración de sustrato, incrementar la agitación o el flujo en el reactor, etc. Con estas medidas se consigue reducir el grosor de la capa de Nernst, y como consecuencia, el valor de K_m' disminuye.

- *Efectos electrostáticos* entre el sustrato y el soporte, de tal manera que, si tienen la misma carga existe una repulsión mutua, mientras que si las cargas son opuestas hay atracción. Cuando el sustrato y el soporte tienen cargas opuestas, el valor de K_m' aparente puede verse reducido hasta varias veces por debajo del obtenido en disolución.

- *Impedimentos estéricos o de tamaño de sustrato.* En un principio, cualquier biocatalizador puede ser inmovilizado sin que haya una pérdida apreciable de su actividad. Este hecho suele ser válido en el caso de que el sustrato sea de bajo peso molecular, pero si se trata de sustratos con pesos moleculares elevados, la actividad de la enzima inmovilizada disminuye drásticamente.

- *Efectos en el microentorno:* La enzima inmovilizada se encuentra en un entorno diferente al habitual, especialmente cuando el soporte tiene grupos cargados eléctricamente. El efecto observado suele ser un desplazamiento en el valor del pH óptimo de la catálisis enzimática y, muchas veces, un ensanchamiento en el intervalo de pH en el cual la enzima puede actuar.

1.1.2.2.3. Selección del método de inmovilización

Aunque se han desarrollado y aplicado muchas técnicas de inmovilización a numerosos biocatalizadores, no existe un método universal válido para cada uno de los biocatalizadores. No obstante, gracias a toda la información disponible en la actualidad, se pueden hacer generalizaciones sobre cada método de inmovilización y así, es posible seleccionar el más adecuado para cada aplicación específica. Para la elección es necesario tener en cuenta las condiciones de la reacción, el tipo de biocatalizador, el tipo de reactor que se vaya a utilizar, el tipo de sustrato que tenga que ser procesado entre otros factores.

La primera selección se realiza en base al tipo de biocatalizador, para la inmovilización de células enteras, el método por atrapamiento es el ideal y se han explorado diversos soportes, como geles poliméricos naturales (pectina, alginato, quitosano, carragenato) y polímeros sintéticos (PVA, poliuretano), y mostraron buenos resultados. Mientras que por su parte en el caso de la inmovilización de enzimas libres es posible aplicar cualquiera de las metodologías mencionadas considerando las ventajas y desventajas de éstas frente a las características de la enzima y el resto de los factores previamente mencionados⁸.

1.1.2.3. Biorreactores

Una vez seleccionado y optimizado el biocatalizador, con la finalidad de ampliar la producción de una escala laboratorio a producción industrial, es necesario emplear un biorreactor para aumentar el volumen de trabajo. Además, como se mencionó anteriormente, los sistemas de inmovilización mejoran la calidad del proceso y, por lo tanto, el uso de biocatalizadores inmovilizados en biorreactores permitirá aumentar el rendimiento general del proceso.

1.1.2.3.1. Tipos de reactores

- *Reactor de tanque agitado*

Este tipo de reactor es uno de los biorreactores más utilizados. Cuando se trabaja en forma discontinua, se colocan el o los sustratos y el biocatalizador en el reactor, y se opera hasta que se agotan los sustratos o se alcanza el equilibrio sustrato-producto (Figura 1.2.a). Consta de

un recipiente cilíndrico, donde el mezclado se produce por agitación mecánica por paletas o por inyección de aire a presión. Suelen tener deflectores internos para evitar la formación de vórtices. Los fermentadores agitados se utilizan para reacciones con biocatalizadores libres e inmovilizados, los que pueden ser dañados por acción de la velocidad de las paletas. Cuando el mezclado se realiza por inyección de aire (Figura 1.2.c), no solo se requiere menos energía sino que la posibilidad de dañar el biocatalizador por la fuerza ejercida en la agitación es menor, en consecuencia, menores costos de operación.

Adicionalmente cuando se trabaja en forma continua, el reactor es similar pero difiere la forma de operación. El biocatalizador se encuentra retenido en su interior, y se va agregando sustrato y retirando mezcla de reacción. Un nuevo ciclo de alimentación se da cuando los reactivos iniciales se han consumido. Esta forma de operación suele emplearse en reacciones en las que la conversión enzimática se da a velocidades muy rápidas o bien que el biocatalizador es costoso o de preparación compleja (Figura 1.2.b, d).

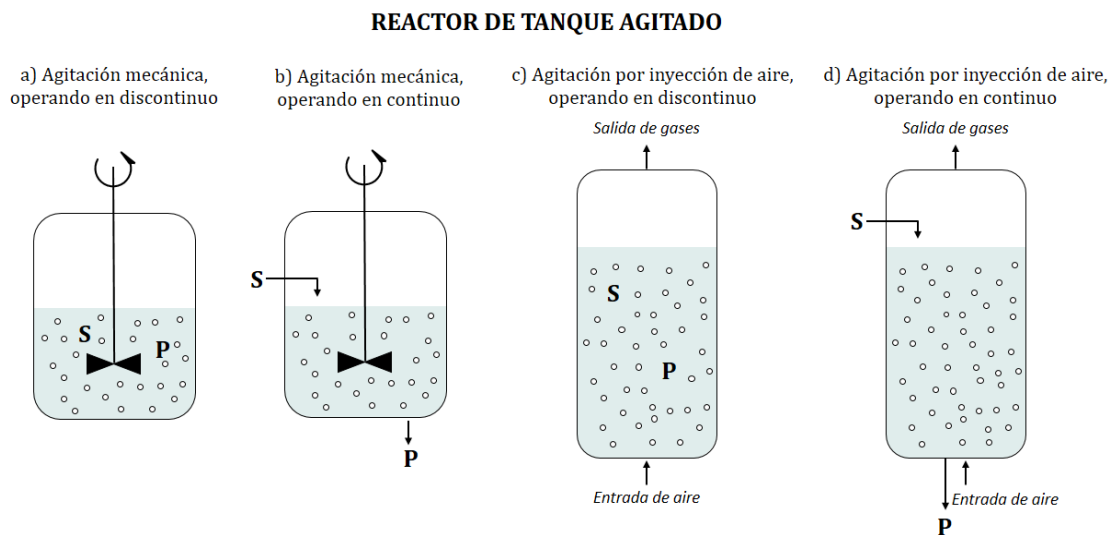


Figura 1.2. Tipos de reactores de tanque agitado, operando en continuo y discontinuo.

- Reactor de lecho empaquetado

Los reactores de lecho empaquetado se utilizan con biocatalizadores inmovilizados o en forma de partículas. Estos reactores tienen un diseño simple y consisten en una columna, que está llena de biocatalizadores y es perfundida continuamente por la fase líquida. En los lechos

empaquetados el daño debido al desgaste de las partículas es mínimo en comparación con los reactores de tanque agitado.

Cuando se opera en discontinuo, los reactivos son inyectados por un extremo de la columna y se colecta el producto parcial por el otro, para luego ser inyectado nuevamente, repitiendo este ciclo hasta lograr la conversión deseada (Figura 1.3.a). Mientras que cuando se opera en continuo en el reactor van ingresando los sustratos de forma constante, y a la salida del mismo puede colectarse el producto formado (Figura 1.3.b). Este es el método de producción en continuo más utilizado a nivel industrial para conversiones enzimáticas de grandes volúmenes de sustrato y para el tratamiento de efluentes y aguas residuales.

Los reactores de lecho empaquetado presentan variaciones entre los que resulta interesante mencionar los *reactores de lecho fluidizado*, el fundamento de operación de estos sistemas está basado en hacer fluir hacia arriba un líquido sobre un lecho empaquetado de partículas de catalizador (Figura 1.3.c), el que se expande debido al movimiento ascendente de partículas. Dicho movimiento constante evita el atascamiento y no se producen canalizaciones^{6,9}.

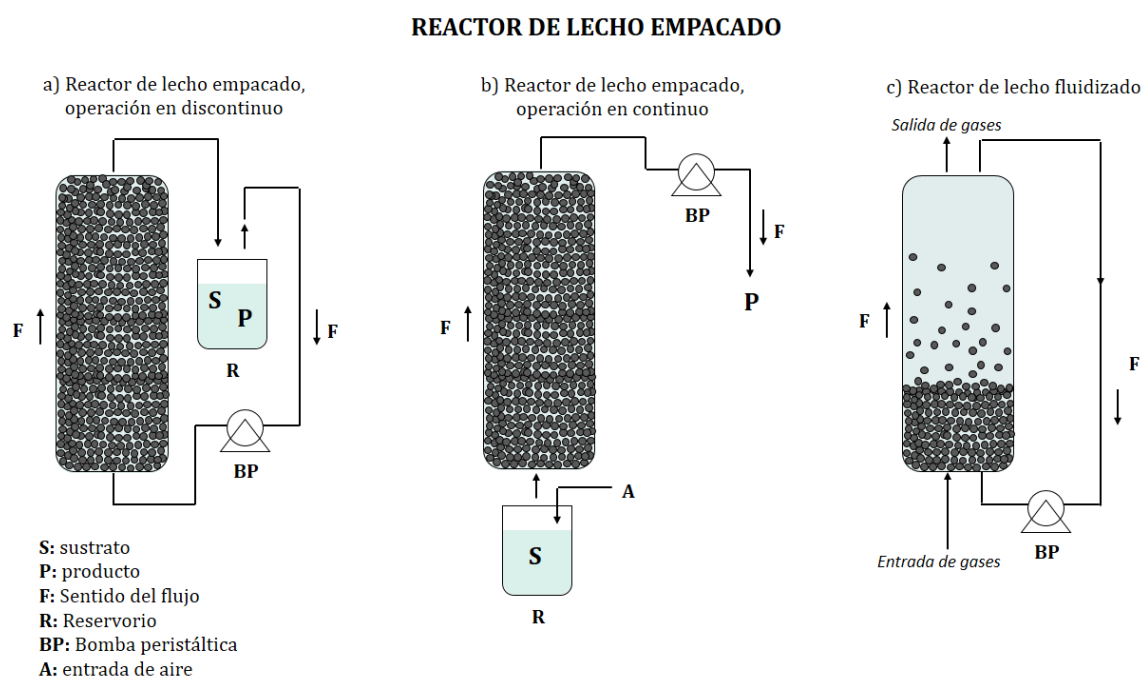


Figura 1.3. Tipos de reactores de lecho empaquetado, operando en continuo y discontinuo.

1.1.2.3.2. Selección y caracterización de la operación de los reactores

La selección y el diseño específico de un sistema de biorreactor incluyen una serie de decisiones a tener en cuenta tales como: la adecuación de los biocatalizadores para su uso en sistemas continuos o discontinuos y, la facilidad de separación del producto para su reutilización. Esta facilidad hace que sea posible diseñar reactores de operación continua con una gran ventaja. Cada uno de los reactores previamente mencionados tiene un uso específico para un proceso diferente, por lo que es esencial usar el reactor apropiado para obtener el máximo rendimiento⁶.

Una vez elegido el reactor hay que realizar el dimensionado del mismo determinando el volumen total de reacción, la cantidad de biocatalizador y las dimensiones del reactor. Como así también determinar su modo de operación, si el reactor funciona en discontinuo la concentración de las diversas especies irá variando con el tiempo. Además, si la reacción tiene lugar en un medio heterogéneo, habrá más de una fase, por lo que es necesario considerar los procesos de transferencia de materia, ya que estos pueden ejercer una gran influencia sobre la velocidad de reacción, como así también el tipo de mezcla, o sea la distribución de los elementos del fluido dentro del reactor. Considerando el tipo de reactor y el modo de operación en el presente trabajo nos concentraremos en la operación bajo flujo pistón, siendo una alternativa a la operación de mezcla perfecta o ideal.

Los reactores con flujo pistón, suelen ser reactores tubulares por cuyos extremos entran los reactivos y salen los productos, por lo que la reacción química se desarrolla a lo largo del recorrido por el espacio tubular. Es físicamente imposible conocer completamente y con detalle el modelo de flujo del fluido a través del recipiente. Sin embargo, con vistas al diseño, es suficiente en muchos casos conocer el tiempo de permanencia de los elementos de fluido en el recipiente. Aunque el flujo total no presenta variación alguna, no todos los elementos de fluido permanecen el mismo tiempo. La distribución de estos tiempos de residencia (DTR) es un parámetro muy importante en el diseño de reactores, ya que representa el tiempo promedio que los reactivos van a permanecer en el interior del reactor en condiciones de régimen estacionario, y por tanto la conversión que se alcanzará en el sistema. En un reactor ideal de flujo pistón todas las moléculas de reactivo permanecerán el mismo tiempo en el reactor, puesto que avanzan como un émbolo en la corriente a través del reactor tubular. En consecuencia, no existe mezcla en la dirección de desplazamiento, siendo los perfiles de

velocidad planos. Es decir, en la superficie perpendicular a la dirección de flujo no hay variaciones en composición⁹.

Si el comportamiento no fuese el ideal, se supone un cierto grado de dispersión axial, o sea retromezcla. A través del modelo de dispersión es posible determinar el coeficiente de dispersión axial (D_z), que da una idea del grado de dispersión. Cuando dicho parámetro es igual o cercano a cero, el comportamiento se acerca más al ideal. Asimismo, mediante este coeficiente es posible determinar el número de Peclet (Pe), parámetro que también da indicios del tipo de flujo bajo el cual se opera en el sistema en estudio.

1.2. BIORREMEDIACIÓN

1.2.1. Generalidades

La biorremediación, es una tecnología que emplea biocatalizadores para remediar o desintoxicar sitios contaminados. Es una metodología rentable y ecológica que permite destruir o hacer inofensivos a diversos contaminantes utilizando la actividad biológica natural. Ésta tiene varias ventajas que han hecho de esta técnica una tecnología preferida sobre otros métodos físico-químicos tradicionales tales como la incineración a alta temperatura, la descomposición química (por ejemplo empleo de bases fuertes para eliminación de compuestos clorados, oxidación por UV) y los vertederos. Aunque pueden ser muy efectivos para reducir una amplia gama de contaminantes, la incineración es un proceso muy costoso, ya que requiere cantidades considerables de energía para alcanzar las altas temperaturas necesarias para destruir los contaminantes y emiten gases potencialmente tóxicos. Por su parte los vertederos proporcionan una solución adecuada a corto plazo, pero la fuente de preocupación es la lixiviación de contaminantes al agua subterránea. Por lo tanto estos métodos tienen varios inconvenientes ya que son complejos, no económicos y carecen de aceptación pública. Las deficiencias asociadas a estas técnicas han promovido el enfoque del proceso de biorremediación como una alternativa adecuada¹⁰. Los principales agentes biológicos utilizados son las bacterias, levaduras u hongos. También incluyen las plantas (Fitorremediación), como así también la interacción de plantas y microbios (Rizorremediación). La biorremediación tradicional en combinación con estas últimas dos

tecnologías contribuyen significativamente al destino de los desechos peligrosos y pueden usarse para eliminar compuestos no deseados de la biosfera.

Los parámetros más importantes para la biorremediación son la naturaleza de los contaminantes, el pH, el contenido de humedad, el estado nutricional, la diversidad microbiana del sitio, la temperatura y el potencial redox¹¹. En este proceso, los microorganismos utilizan los contaminantes como fuente de nutrientes o energía.

1.2.1.1. Ventajas

- La biorremediación es un proceso natural y, por lo tanto, es percibida por el público como un proceso de tratamiento de desechos aceptable para materiales contaminados. Los residuos para el tratamiento suelen ser productos inocuos e incluyen dióxido de carbono, agua y biomasa celular.
- En lugar de transferir contaminantes de un medio ambiente a otro, por ejemplo, de la tierra al agua o al aire, es posible la destrucción completa de los contaminantes objetivos.
- La biorremediación a menudo se puede llevar a cabo en el sitio, sin causar una interrupción importante de las actividades normales. Esto también elimina la necesidad de transportar cantidades de desechos fuera del sitio y las amenazas potenciales para la salud humana y el medio ambiente que pueden surgir durante el transporte.
- La biorremediación puede resultar menos costosa que otras tecnologías que se utilizan para la limpieza de desechos peligrosos.

1.2.1.2. Desventajas

- La biorremediación, aunque se considera un beneficio en medio de las situaciones ambientales actuales, también puede considerarse problemática porque, si bien se agregan aditivos para mejorar el funcionamiento de una bacteria, hongos u otros microorganismos en particular, puede ser perjudicial para otros organismos que habitan en el mismo ambiente cuando se hace *in situ*. En particular, si se utilizan los microorganismos modificados genéticamente puede ser difícil eliminarlos.
- La biorremediación se limita a aquellos compuestos que son biodegradables. No todos los compuestos son susceptibles de degradación rápida y completa.

- Los procesos biológicos son a menudo altamente específicos. Los factores importantes del sitio requeridos para el éxito incluyen la presencia de poblaciones microbianas metabólicamente capaces, condiciones de crecimiento ambiental adecuadas y niveles apropiados de nutrientes y contaminantes.
- Es difícil extrapolar los estudios analíticos y de escala piloto a operaciones de campo a escala completa.
- Se necesita investigación para desarrollar y diseñar tecnologías de biorremediación que sean apropiadas para sitios con mezclas complejas de contaminantes que no están dispersas de manera uniforme.
- La biorremediación a menudo toma más tiempo que otras opciones de tratamiento, como la excavación y remoción de suelo o la incineración.

Existen dos tipos de biorremediación *in situ* o *ex situ*, la selección entre ellas dependerá del medio a tratar. La primera no precisa excavar o remover los suelos o el agua para lograr la remediación. Involucra el suministro de oxígeno y nutrientes mediante la circulación de soluciones acuosas a través de suelos contaminados para estimular las bacterias naturales para degradar los contaminantes orgánicos, también puede emplearse para el tratamiento de aguas. La biorremediación *ex situ* requiere la excavación o remoción de suelo contaminado o el bombeo de aguas para facilitar la degradación microbiana. Según el estado del contaminante a eliminar, la biorremediación *ex situ* se puede llevar a cabo por sistemas de fase sólida o en suspensión.

Considerando el consumo creciente de agua dulce, la eliminación de aguas residuales industriales contaminadas como así también la presencia de plaguicidas en aguas de ríos y lagos por su amplio y constante uso en la agricultura, conlleva a prestar especial atención al tratamiento de aguas. Por lo general los sistemas en suspensión son los más empleados y, el tratamiento consta de la combinación del agua contaminada y biocatalizadores inmovilizados en el biorreactor. Cuando se completa el tratamiento, el agua se elimina de los sólidos, o se tratan más si aún contienen contaminante^{12, 13}.

El tratamiento biológico de aguas residuales ha sido aplicado en la industria desde el siglo XX. Entre los biocatalizadores más empleados se encuentran aquellos con actividad peroxidasa, reductasa, oxidasa e hidrolítica⁷. La inmovilización de dichos biocatalizadores, especialmente la adhesión microbiana a las superficies (*biofilm*), se ha estudiado intensamente para el tratamiento de la contaminación del agua. En base a dicha metodología,

por ejemplo se inmovilizaron tres cepas bacterianas en un único *biofilm* para el tratamiento de aguas residuales que contenían acetonitrilo. Dicho sistema mostró una alta resistencia a la carga de acetonitrilo y consumió completamente dicho sustrato en 24 h en un reactor de lecho empaquetado. Los resultados demostraron que las bacterias inmovilizadas en el biofilm pueden mejorar los rendimientos obtenidos y considerarse una nueva técnica para la degradación de los contaminantes en las aguas residuales¹⁴. Por su parte la peroxidasa de rábano picante se inmovilizó en nanotubos de quitosano con reticulación mediante el uso de glutaraldehído. Con este nuevo material de soporte, la carga máxima de enzimas alcanzó 21,5 mg g⁻¹, dicho biocatalizador permitió la eliminación total de fenol de las aguas residuales¹⁵.

Por su parte el tratamiento de organofosforados como el metil paratión fue llevado a cabo con una fosfotriesterasa que fue inmovilizada covalentemente en fibras de poliéster. Cuando dicho biocatalizador fue empleado en un reactor de tanque agitado se alcanzó una degradación de 20 µM de MP en agua no tamponada en 2 h. Mientras que cuando operó con un reactor de lecho fluidizado en continuo con el mismo biocatalizador, se alcanzó una degradación 50 µM MP a altas tasas de flujo y se pudo usar repetidamente durante 2 meses¹⁶. Finalmente, es importante considerar que las matrices de soporte utilizadas para la inmovilización pueden tener un alto costo para el proceso. Por lo tanto, es importante elegir matrices económicas, en este marco se emplearon fibras de “arpillera” (saco de yute) para inmovilizar *Aspergillus terreus* siendo útil en la decontaminación de contaminantes como así también otros desechos orgánicos que están presentes en efluentes^{6, 17}.

1.3. COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS

1.3.1. Generalidades

Los compuestos organofosforados (OPs), son generalmente ésteres del ácido fosfórico o sus derivados, que han sido sintetizados globalmente hacia finales de la Segunda Guerra Mundial. Estos compuestos han sido utilizados como insecticidas y como armas químicas¹⁸. En 1937 fue sintetizado y desarrollado el primer OP, el tetraetilpirofosfato, posteriormente fueron sintetizados como armas químicas entre ellos el tabún, sarín, soman y XV¹⁹. Desde entonces una serie de OPs han sido desarrollados y comercializados como plaguicidas. Se los

puede clasificar como fosfotriéster, tiofosfotriéster o fosfotioléster. Son del tipo fosfotriésteres si contienen un centro fosfato unido a tres grupos -OR, mientras que si el oxígeno del fosforilo es reemplazado por un azufre serán tiofosfotriésteres. Además, estos compuestos pueden tener más de un éster azufrado, llamados fosfotiolésteres²⁰ (Figura 1.4).

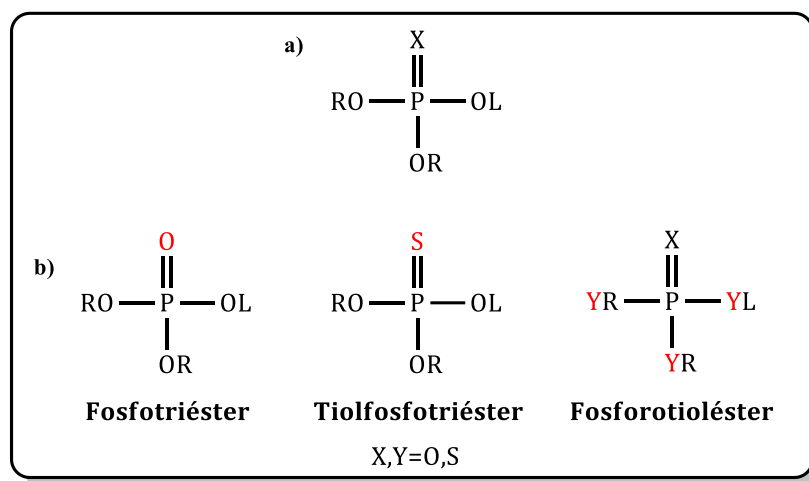


Figura 1.4. a) Estructura general y b) clasificación de los compuestos organofosforados.

Actualmente, los OPs son empleados como aditivos en el petróleo y como pesticidas. Su mayor aplicación es como insecticidas en la industria agrícola para proteger los cultivos, incluso se los utiliza en interiores para mantener ambientes libres de insectos a fin de controlar vectores de posibles enfermedades²¹. Estos ocuparon casi el 44% del mercado mundial de insecticidas en 2016, con más de 100 insecticidas OPs comercializados. A pesar de su amplia utilización, son altamente tóxicos para los mamíferos incluyendo los humanos. Se han reportado 3 millones de intoxicaciones y 200 mil muertes anuales por exposición a ellos²². Su toxicidad se debe a la inhibición de la enzima acetilcolinesterasa (AChE) en el sistema nervioso, produciendo un síndrome colinérgico. La AChE es responsable de la hidrólisis del neurotransmisor acetilcolina (ACh), éste es un componente vital del sistema nervioso, permite la transmisión y regulación del impulso nervioso en el cerebro, sistema esquelético y muscular (Figura 1.5. a). La correcta funcionalización de dicha enzima, involucra la unión de ACh al sitio activo de la AChE para luego ser atacada por una molécula de agua, liberando acetilCoA (Figura 1.5. b). Cuando la AChE es inhibida por OPs el mecanismo es similar (Figura 1.5. c). Inicialmente, el OP fosforila el mismo centro activo al que se une ACh de manera covalente. En consecuencia, la hidrólisis por la AChE fosforilada es extremadamente lenta;

causando una sobreestimulación en los receptores de ACh en la sinapsis, lo que conlleva a la sobreestimulación sistema nervioso central y neuromuscular. Los síntomas iniciales presentados son hipersalivación, visión borrosa, urinación, confusión, agitación, lacrimación, convulsión, fallas en el sistema respiratorio y cardiovascular, y finalmente la muerte^{24, 25,26}.

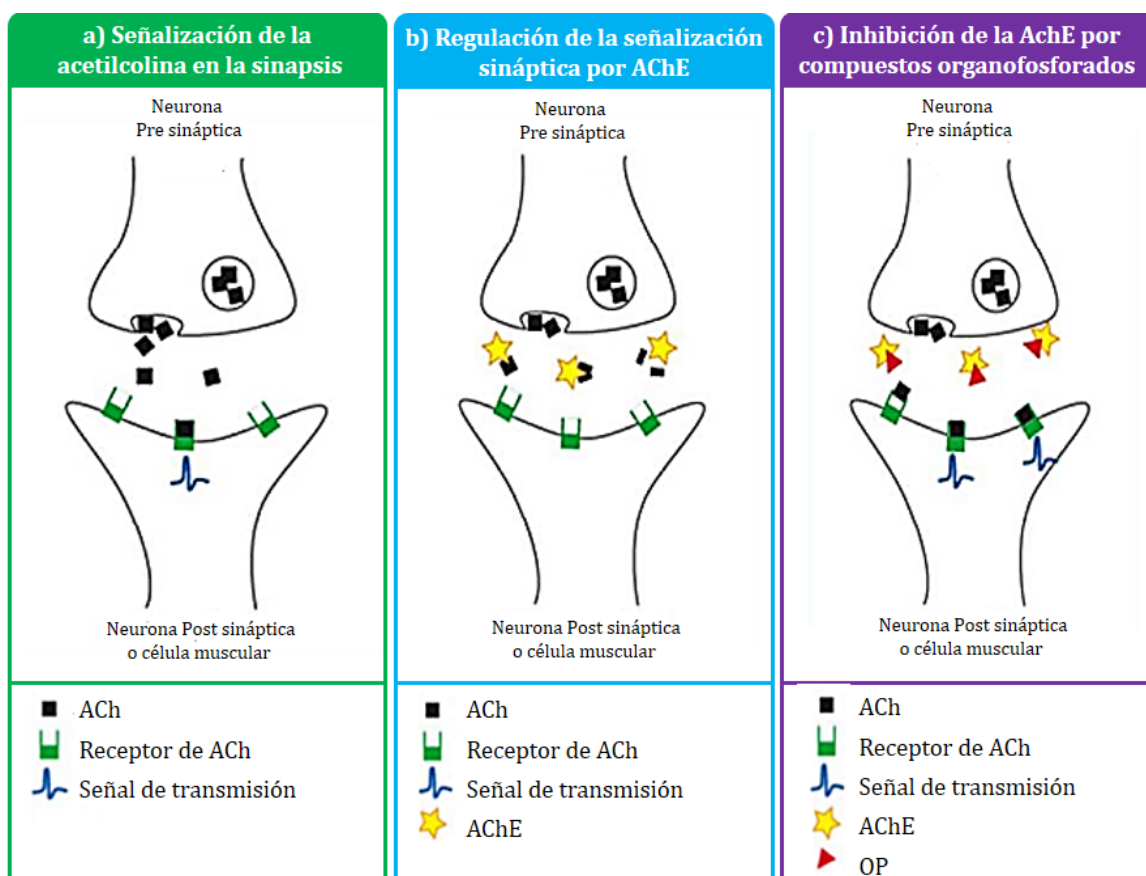
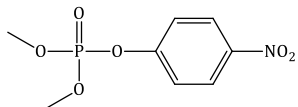
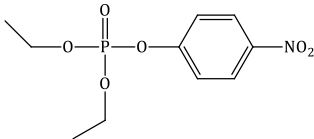
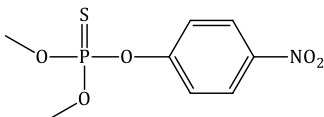
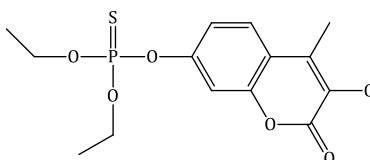
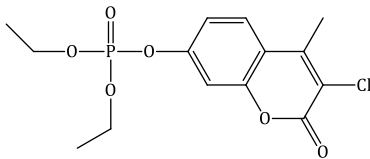
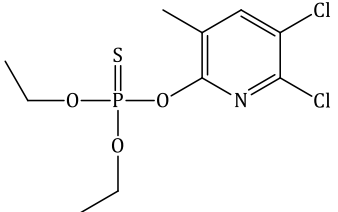
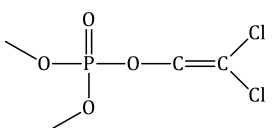


Figura 1.5. Mecanismo de acción de los compuestos organofosforados²⁷.

Los pesticidas organofosforados han comenzado a utilizarse con mayor frecuencia a fin de reemplazar los pesticidas del tipo organoclorados, reduciendo drásticamente el uso de estos últimos, los que poseen menor efectividad, mayor persistencia y tendencia a la bioacumulación. Entre los OPs más estudiados y utilizados podemos mencionar: glifosato, clorpirifós, paratión, metil paratión, paraoxón, diazinón, cumafós, monocrotofós, fenamifós, diclorvós y forato². A continuación se presenta una tabla con las estructuras químicas, niveles de toxicidad y persistencia de alguno de ellos (Tabla 1.1.).

Estructura química	Nombre de formulaciones comerciales	Tipo	LD50 (mg kg ⁻¹)	Persistencia en suelo (Días)
	Metil paraoxón	-	6-8	ND
	Paraoxón Miotisal A®, E 600®, Fosfakol®, Pestox 101®, Mintacol®	Insecticida	2-4	ND
	Metil paratión Metaphos®, Vofatox®, Wofatox®, Dalf®, Nitrox 80®, Folidol 600®	Insecticida	3-30	25-130
	Cumafós Baymix®, Resitox®, Azunthol®, Agridip®, Muscatox®	Acaricida	16-41	24-1400
	Coroxón	-	ND	ND
	Clorpirifós Brodan®, Detmol UA®, Dowco 179®, Dursban®, Empire®, Lorsban®, Paqeant®, Piridane®, Scout®	Insecticida	135-163	10-120
	Diclorvós Bop®, Dede vap®, Denkavepon®, Divipan®, Fluid®, Nuvan®, Oko®, Parasitol®, Vapona®	Insecticida	24-1400	10-120

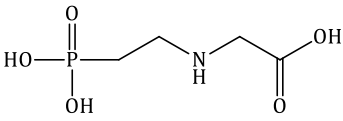
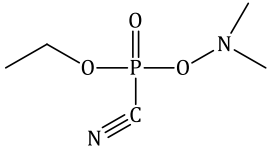
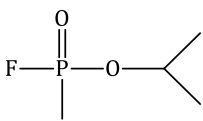
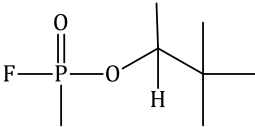
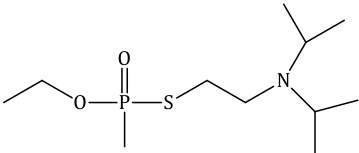
	Glifosato	Herbicida	3530-5600	30-174
	Tabun GA	Armas químicas	150-400*	1,25-2,5
	Sarín GB	Armas químicas	75-100*	ND
	Soman GD	Armas químicas	35-50*	ND
	XV	Armas químicas	10*	4-42

Tabla 1.2. Estructura química, toxicidad y tiempo de vida media en suelo de diferentes OPs^{12, 28}.

*Los agentes neurotóxicos Tabún y VX se expresan en dosis letal por inhalación ($\text{mg min}^{-1} \text{ m}^{-3}$) debido a que son muy volátiles.

• **Paraoxón** (*O,O*-dietil-*O-p*-nitrofenilfosfato; **PO**) es el metabolito activo del insecticida paratión (*O,O*-dietil-*O-p*-nitrofenilfosforotioato). Se utiliza como fármaco oftalmológico contra el glaucoma, sin embargo el PO es uno de los insecticidas inhibidores de acetilcolinesterasa más potentes disponibles, su toxicidad es aproximadamente el 70% de la reportada para el agente nervioso sarín, por lo que actualmente rara vez se usa como insecticida debido al riesgo de envenenamiento para humanos y otros animales, inclusive está prohibido en la mayoría de los países en el mundo. Se absorbe fácilmente a través de la piel y fue utilizado como arma de asesinato por el proyecto de armas químicas y biológicas sudafricanos Project Coast²⁹.

Existen estudios en hígados de ratones que demuestran que las enzimas del citocromo p450 (CYP) median la biotransformación oxidativa del paratión a paraoxon, inhibiendo otras enzimas que juegan un rol importantísimo en la oxidación de muchos agentes terapéuticos,

por lo que la exposición a paratión, puede afectar negativamente a la eliminación de fármacos en humanos³⁰.

- **Metil paratión** (*O,O*-dimetil-*O-p*-nitrofenilfosforotioato; **MP**) es un insecticida sintetizado en 1952 en Estados Unidos (EE. UU.), pero en 1978, el MP fue clasificado como un “Pesticida de uso restringido” debido a su potencial para dañar a humanos y aves. El MP es un eficaz insecticida de amplio espectro destinado al uso en exteriores para matar insectos y ácaros, principalmente en cultivos agrícolas de algodón. El uso de MP también se ha extendido a los cultivos de arroz, frutas y hortalizas. Otro uso importante de la MP es como un acaricida contra el gorgojo³¹. En el medio ambiente, el MP es liberado en el aire por pulverización directa y por volatilización. El pesticida se deposita y es adsorbido por el suelo, las plantas y otras superficies. También puede oxidarse a su análogo, metil paraoxón por fotólisis en aire depositándose en el agua superficial. MP es menos persistente cuando se lo usa en el exterior en consecuencia cuando se utiliza en interiores, el producto químico permanece estable durante largos períodos de tiempo, es por ello que no está aprobado para dicho uso^{32, 33}.

La Agencia de Protección Ambiental (EPA, EE. UU.) y la Organización Mundial de la Salud (OMS), lo clasificaron como un insecticida de Categoría I (el más tóxico). Aun así este compuesto se usa en gran parte en la agricultura y en criaderos de peces³⁴. Incluso diversos estudios a lo largo del mundo revelaron que vegetales y frutas recogidos de supermercados estaban contaminados con pesticidas OPs, como el MP, excediendo el límite máximo residual permitido³⁵. Adicionalmente se demostró la presencia de MP en leche³⁶, en queso³⁷, y en formulaciones para niños³⁸.

- **Metil paraoxón** (*O,O*-dimetil-*O-p*-nitrofenilfosfato, **MPO**) posee una estructura similar al PO, pero sus cadenas alquílicas en vez de ser grupos etilos, son metilos. También es el análogo oxigenado del MP, y si bien no se emplea en pesticidas comerciales, sí se lo utiliza a escala de laboratorio para evaluar su efecto tóxico³⁹. Adicionalmente, se ha empleado MPO dentro de un conjunto de OPs estructuralmente similares con la finalidad de evaluar la aceptación de sustrato por diferentes fosfotriesterasas⁴⁰.

Se ha reportado que la exposición de mamíferos a metil paratión, el que puede oxidarse a MPO en el cuerpo, es altamente tóxico⁴¹. Al igual que el resto de los OPs inhibe a la AChE, y produce numerosos efectos adversos en el sistema reproductivo masculino⁴² como: casos de atrofia testicular⁴³, alteraciones en la estructura y función de la epidermis y las glándulas

accesorias sexuales⁴⁴, descenso en el conteo de espermatozoides⁴⁵, aumento de anomalías en la cabeza de los espermatozoides⁴⁶ y alto porcentaje dañado de DNA en espermatozoides en individuos expuestos a MP⁴⁷. También, se observó que durante el período de gestación en ratones se produjo fibrosis y hemorragias en el endometrio y la muerte del feto^{48, 49}.

- **Cumafós** (*O,O*-dietil-*O*-(3-cloro-4-metil-2-oxo-2H-1-benzopirano-7-il) fosforotioato; **CP**) se introdujo como insecticida en 1954 y se ha utilizado ampliamente, particularmente para el control de plagas de artrópodos en animales domesticados⁵⁰. Éste posee una vida media de aproximadamente 300 días⁵¹ y altamente tóxico para mamíferos.

Se ha utilizado en el control del ácaro parásito *Varroa jacobsoni* que infesta a las abejas, *Apis mellifera*. Si bien era muy efectivo, debido a su naturaleza no polar parte de dicho compuesto se encontró en la cera y en la miel⁴⁰. También se lo ha empleado como un acaricida para el control de garrapatas del ganado, por lo que diferentes agencias gubernamentales lo aplicaron con fines de erradicación de garrapatas. Para dicho procedimiento, se cuenta con una serie de cubas de inmersión ubicadas en los puntos fronterizos, en las que se induce al ganado a sumergirse en CP. Solo en EE. UU. Hay alrededor de 42 depósitos y cada depósito contiene aproximadamente 15000 L de suspensión de CP con una concentración de 1600 mg L⁻¹ ^{53,54}. La problemática de estas metodologías no son solo la exposición a los animales a altas concentraciones de OP, sino también que la limpieza de dichas cubas genera aproximadamente 4,6 10⁵ L de residuos de insecticida concentrados por año solo en EE. UU⁵⁵. Se cree que existe un programa similar dentro de México que produce un volumen mucho mayor de residuos.

- **Coroxón** (3-cloro-7-dietoxifosfinoiloxi-4-metil-2-cromenona, **CO**) es el análogo oxigenado del CP. Al igual que el MPO no se lo utiliza en formulaciones como compuesto activo de pesticidas, pero por ser del tipo oxón, es más reactivo y soluble. También como el par MP-MPO, el CP puede oxidarse a CO y permanecer en aguas residuales de zonas donde se haya aplicado CP. El uso más frecuente de CO, es a escala laboratorio para llevar a cabo *screening* de actividad fosfotriesterasa⁵⁶ considerando que uno de los productos de hidrólisis es el clorferón (CF), al ser éste fluorescente los niveles de detección son mayores, por lo que la metodología es más sensible⁵⁷.

- **Diclorvos** (2,2-diclorovinil dimetilfosfato; **DDVP**) es un insecticida ampliamente utilizado contra pulgas, orugas, moscas y arañas como control activo en productos domésticos y almacenados, como agente activo en fumigaciones en el control de plagas y en la fabricación de collares para mascotas⁵⁸. Por su parte, en la agricultura también son empleados para controlar insectos que viven en el arroz, cereales, frutas, vegetales, soja y algodón⁵⁹.

El DDVP entra en el medio ambiente durante su manufacturación, debido a derrames durante su transporte y pérdidas en los contenedores de almacenamiento, pero mayoritariamente la contaminación con este compuesto se debe a su uso en campos abiertos dado que el DDVP es muy estable, en agua y/o suelos⁶⁰. Es altamente tóxico por inhalación, absorción dérmica e ingestión⁶¹. Los efectos de dicho OP en microorganismos procarióticos y eucariotas han sido revisados por la OMS considerándolo como un compuesto moderadamente tóxico (clase II)⁶², mientras que por su parte EPA lo ha clasificado como un compuesto tóxico de clase I⁶³. La exposición crónica del DDVP se relacionó con mayor riesgo de desarrollar diabetes¹⁶, disfunciones hepáticas⁴⁸ como así también cáncer por lo que la Agencia Internacional para la Investigación del Cáncer (IARC) lo clasificó como Grupo 2B, posiblemente carcinógeno para los seres humanos⁶⁴.

- **Clorpirifós** (0,0-dietil-O-(3,5,6-tricloro-2-piridil) fosforotioato) es un insecticida introducido por Dow Chemical en el año 1965 en EE.UU.⁶⁵. Actualmente es uno de los insecticidas y acaricida sistémicos y eficaces contra insectos chupadores y masticadores e insectos dañinos de cultivos económicamente importantes. Se utiliza para el control de mosquitos (larvas y adultos), moscas, ácaros, gusanos blancos, escarabajos de las hojas y pulgas, gusanos de la raíz, saltamontes, escarabajos de la pulpa, y moscas blancas. También se utiliza para el control de ectoparásitos en ganado bovino y ovino^{15, 66}.

Si bien una cantidad considerable del pesticida se acumula en el suelo o ingresa al agua después de la aplicación, menos del 0,1% del total del pesticida aplicado alcanza el objetivo y el resto permanece en el ambiente. Es por ello que los organismos vivos están expuestos a residuos de pesticidas en el suelo y el agua, lo que genera un riesgo para el equilibrio ecológico. Se detectaron residuos de CPP hasta ocho años después de la aplicación para el tratamiento de termitas en casas, también hay algunos informes sobre residuos de CPP en la cadena alimenticia⁶⁷. Además, también se han reportado daños graves a especies no objetivo, como la alteración endocrina, defectos de nacimiento, bajo peso al nacer, reducción de la circunferencia de la cabeza, trastornos del sistema nervioso y anomalías del sistema

inmunológico^{68, 69}. Además, se encuentra asociado con cáncer de vejiga y daño cromosómico. De manera similar, se ha observado hiperglucemia en varios animales como resultado de exposiciones agudas y subcrónicas de CPP⁷⁰.

1.3.2. Uso de plaguicidas y su problemática en Argentina

Argentina es la décima nación agrícola del mundo, clasificada según el área de cultivo en un informe publicado por el Banco Mundial, basado en cifras producidas por la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO). Con 31 millones de hectáreas dedicadas a la agricultura, Argentina se ubica por detrás de Estados Unidos, India, Rusia, China, Brasil y Australia y representa el 2.2% del área total de cultivos del mundo⁷¹. El mercado agroquímico argentino se ha expandido fuertemente en los últimos años, con un aumento en el consumo de 73 a 236 millones de kg por año en los últimos 10 años. Esto representa una facturación total de U\$S 2381.16 millones en 2012 y tiene la siguiente distribución: 64% herbicidas, 16% insecticidas, 20% fungicidas, acaricidas y curas de semillas⁷². Adicionalmente en 2014, Argentina fue el segundo mayor consumidor de pesticidas, es decir, 208 millones de kg de ingredientes activos consumidos⁷³. Un estudio realizado por la Universidad de Córdoba en conjunto con el Ministerio de Salud, indicó que los principios activos más utilizados en la actividad agrícola extensiva en nuestro país son: a) herbicidas: glifosato, 2,4-D, clorimurón, metsulfurón, atrazina, acetoclor y flurocloridona; b) insecticidas: cipermetrina, clorpirifós; c) fungicidas: tebuconazol, piraclostrobin + epoxiconazol y azoxistrobin + ciproconazol. En la figura 1.6. se observa el índice de exposición a dichos pesticidas (IEP) en concordancia con actividad productiva de cultivos y, el tipo de suelo y clima. Santa Fe, Buenos Aires, Córdoba y Entre Ríos son las provincias más afectadas, mientras que en el otro extremo, con menores IEP se observan Formosa, Corrientes y Misiones⁷⁴.

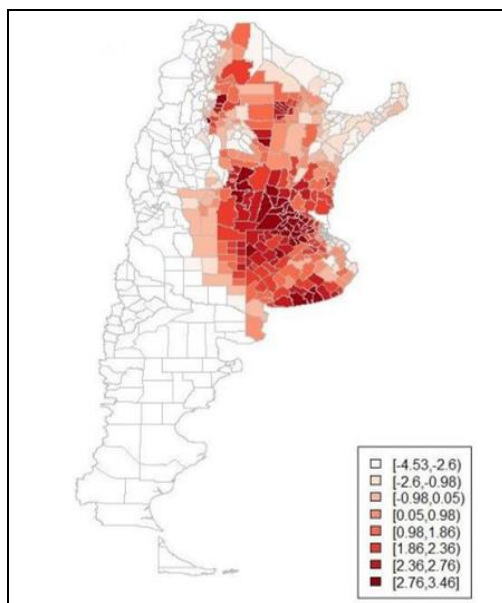


Figura 1.6. Índice de exposición a pesticidas (IEP)⁷⁴.

El mayor porcentaje de utilización de plaguicidas son en el área agrícola, pero se debe considerar además, que hay una gran cantidad de plaguicidas que se usan para combatir plagas y vectores en el ámbito hogareño y en sanidad animal, como: insecticidas de uso general, repelentes de insectos, raticidas y rodenticidas, fumígenos, hormiguicidas, pulguicidas – garrapaticidas, larvicidas, control de moscas y mosquitos, polillas, ácaros; y cucarachicidas. La utilización de medicamentos de uso veterinario y de algunos OPs en el ganado es una práctica común para prevenir y controlar diversas enfermedades⁷⁵.

Aunque el uso de pesticidas ha contribuido a mejorar la producción de alimentos ha desatado también consecuencias negativas sobre el ambiente y la vida humana. Los seres humanos pueden estar expuestos a los plaguicidas por diferentes maneras, como las exposiciones no intencionales o indirectas, que pueden estar relacionadas con el uso profesional de los plaguicidas, por ejemplo, las que sufre el trabajador rural en el desarrollo de sus actividades y con exposiciones casuales, que afectan por ejemplo, a la gente de los pueblos aledaños a cultivos que sufren estas exposiciones por efectos de aplicaciones mal realizadas. En esta categoría se incluye también a la población en general, que puede estar expuesta a través de residuos de plaguicidas que quedan en los alimentos o la contaminación del agua, del aire o del suelo. Si bien para esta gran masa poblacional la exposición es baja, los efectos tóxicos resultantes de esa exposición prolongada suelen ser difíciles de distinguir, pasando, en general, en forma inadvertida. En este marco, se han realizado diversos estudios

del efecto en la población rural al contacto constante con químicos peligrosos, y la falta de educación sobre los peligros de estos químicos y de recursos para afrontarlos. Se ha visto una acumulación de casos de enfermedades como deformidades espinales, defectos de nacimiento, e instancias de cáncer⁷⁶. Una investigación en la provincia de Santa Fe, en una zona rural de producción de soja arroja que el 80% de los niños examinados llevaban residuos de químicos tóxicos en la sangre; esta intoxicación se atribuyó a la falta de agua corriente y al uso de agua contaminada para bañarse, beber, y para lavar la ropa⁷⁷. Por su parte, otro estudio sobre el pueblo Avia Terai en la provincia de Chaco ofrece otro ejemplo específico del problema de los plaguicidas, donde la gente de este pueblo trabaja en las manchas de la soja y diariamente están en contacto directo con los plaguicidas y viven en proximidad de los campos donde la fumigación de plaguicidas ocurre. Los granjeros fumigan estas regiones regularmente a pesar de la regulación que prohíbe fumigar dentro de 500 metros de las zonas pobladas⁷⁸.

Por otro lado, y como bien se ha mencionado, los plaguicidas también se utilizan en el control de plagas y enfermedades de cultivos destinados a la alimentación del ganado lechero, como pastos, alfalfa, sorgo y maíz, entre otros. Cuando estas sustancias se aplican inadecuadamente pueden generar residuos tóxicos que a su vez pueden detectarse en la carne y en la leche. Entre los residuos de medicamentos más comunes detectados se encuentran las sulfonamidas y nitrofuranos, que se usan para el control de enfermedades infecciosas en la vaca, mastitis por ejemplo, y los plaguicidas organofosforados, que se aplican como ectoparasitarios para el control de moscas y garrapatas, principalmente⁶³.

Los efectos ambientales también demuestran los problemas asociados con el uso desregulado de los plaguicidas en Argentina. Hay tres consideraciones en las investigaciones ambientales en cuanto al agroquímico: su retención en el suelo, su movimiento por el suelo, y su proceso de degradación⁷⁹. Hay una presencia de plaguicidas en diferentes niveles del suelo que contamina el agua y se acumula en los ríos y lagos (Figura 1.7.).

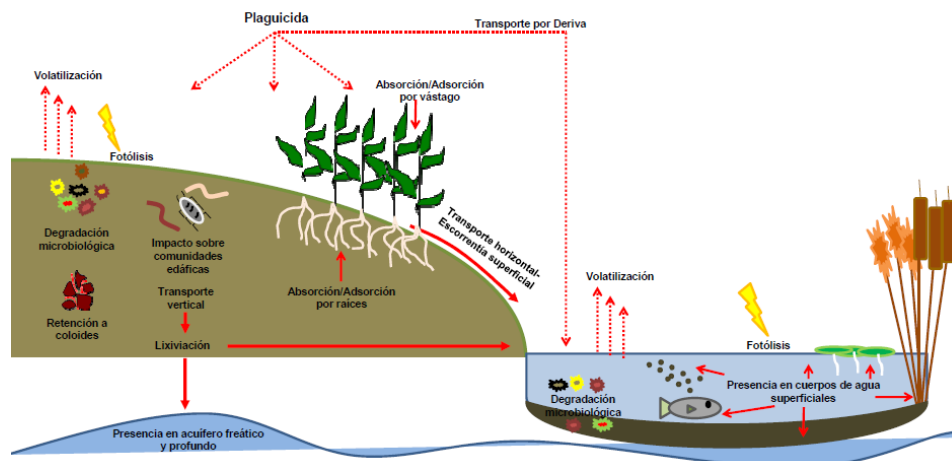


Figura 1.7. Esquema que representa los destinos de un plaguicida en el ambiente⁸⁰.

En la región de Buenos Aires, una región importante para la producción de soja modificada, hay niveles de agroquímicos tóxicos en los ríos pequeños causados por la acumulación de plaguicidas en áreas de producción masiva, también hay una absorción de plaguicidas por las raíces de otras plantas. Hay cambios en los niveles de minerales saludables en el agua y en la acidez del suelo produciendo inestabilidad en los ciclos naturales que existen⁸¹.

Es por ello que se ha estudiado la distribución espacial del índice de impacto ambiental total (IIAT), para cada uno de los plaguicidas más utilizados en nuestro país. Como es de esperarse, la región del país que posee, en promedio, los valores más altos de IIAT es la pampeana, más que duplicando el valor promedio del índice para el Nordeste del país (2do lugar). Dentro de los pesticidas más empleados, nos centraremos en el impacto producido por CPP. Éste es el segundo pesticida de mayor impacto, luego del glifosato siendo aplicado en cultivos extensivos, como los cereales, e intensivos, tales como hortalizas y frutales⁸². En el mapa de IIAT producido por el uso de CPP (Figura 1.8.) se muestran altos índices en aquellos departamentos cuya superficie cultivada emplea frecuentemente dicho OP. Por ejemplo, el depto. San Cayetano (Buenos Aires), posee el IIAT más alto del país para CPP.

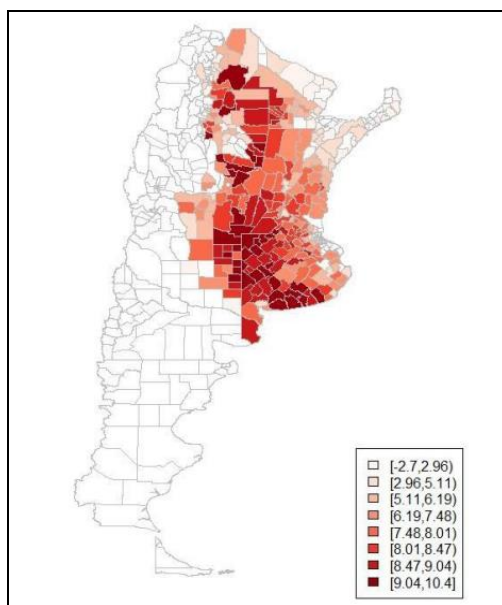


Figura 1.8. Índice de impacto ambiental total del clorpirifós⁷⁴.

Es indiscutible que la aparición de los productos agroquímicos permitió importantes mejoras en la agricultura moderna, sin embargo el uso y abuso de los agroquímicos generó grandes consecuencias negativas⁸³, produciendo una situación de compromiso entre la producción y exportación de productos agrícolas, con la protección de la población consumidora. Actualmente, se ha comprobado la correlación entre el uso de plaguicidas tóxicos y un aumento de enfermedades peligrosas en comunidades rurales. También se han reportado datos sobre la calidad del agua en las corrientes argentinas, los que son críticos como la acumulación de plaguicidas en fuentes de agua rural, presentando un problema de salud que es evidente en las tasas de enfermedades graves.

Los efectos adversos para la salud y el medio ambiente causados por la contaminación con pesticidas han dado lugar a emplear esfuerzos para hacer frente a dicha problemática. Las técnicas convencionales utilizadas para la remediación de estos productos químicos pueden ser efectivas, pero también pueden asociarse con muchos inconvenientes como la complejidad, el costo y la falta de aceptación pública. La solución ideal para la reducción de la contaminación es la biorremediación⁹, en consecuencia la búsqueda y obtención de microorganismos o enzimas capaces de degradar compuestos del tipo organofosforados presenta especial atención.

1.4. FOSFOTRIESTERASAS

Las fosfotriesterasas (PTEs; E.C. 3.1.8.1) constituyen un grupo de enzimas que catalizan la hidrólisis estereoselectiva de un gran número de fosfotriésteres. Estas enzimas se han encontrado a lo largo de la escala evolutiva, desde bacterias hasta mamíferos, con excepción de los insectos⁸². La reacción de hidrólisis involucra un mecanismo de adición nucleofílica de una molécula de agua activada al fosfotriéster y la eliminación concertada de un grupo saliente (mecanismo SN₂), que da origen a la inversión de la configuración absoluta del átomo de fósforo del fosfodiéster resultante⁸⁵.

Las PTEs mejor caracterizadas son las de *Brevundimonas diminuta* y de *Flavobacterium sp.*, y las paraoxonasas séricas humana y de conejo⁸⁶. La primera fue aislada de un cultivo enriquecido en EE. UU., mientras que la segunda fue aislada en 1973 de una muestra de suelo en Filipinas⁸⁵. Esta enzima ha sido asociada a la degradación de una amplia variedad de agentes toxicológicos organofosforados tales como gases nerviosos y pesticidas de uso agrícola, demostrando ser altamente eficiente. Desde entonces se han aislado diferentes bacterias, hongos y cianobacterias capaces de degradar estos compuestos utilizándolos como fuente de carbono, energía, nitrógeno o fósforo⁸⁸. En general estas enzimas se encuentran ancladas a la membrana celular, como por ejemplo las de *B. diminuta* y *Flavobacterium*, sin embargo existen excepciones, como la PTE fúngica de *Aspergillus niger* que es extracelular. Se cree que las PTEs han evolucionado durante los últimos 70 años, ya que los OPs no existieron en ningún ambiente hasta después de la Segunda Guerra Mundial. Se cree que una lactonasa pudo evolucionar hidrolizando OPs en bajos niveles debido a una actividad promiscua y así conferirle una ventaja que permitió la divergencia hacia una nueva enzima. Se han reportado lactonasas capaces de degradar OPs, y también PTEs con actividad lactonasa⁸⁹.

Existen tres tipos de PTEs bien caracterizadas en bacterias, diferenciadas entre sí por la evolución de sus genes. La Organofósforo Hidrolasa (OPH) y la Metil Paratión Hidrolasa (MPH), codificadas en los genes *opd* y *mpd*, provienen de la evolución de dos lactonasas distintas, mientras que la Anhidrolasa Ácida de Organofosforados (OPAA), codificada en el gen *opaA*, proveniente de una proteasa (dipeptidasa)⁹⁰.

- **Organofósforo hidrolasa (OPH)** codificada en el gen *opd*, ha sido purificada de *B. diminuta* y *Flavobacterium sp.*, éstas comparten una homología casi idéntica en sus secuencias aminoacídicas^{91, 92}. Existe también una variante de esta enzima llamada OPDA la cual esta

codificada en el gen *opdA*, y fue purificada de *Agrobacterium radiobacter*⁹³. La OPH contiene un núcleo en forma de barril conformado por ocho láminas- β rodeadas de ocho α -hélices, el fondo del barril está conformado por los loops que conectan una láminas- β con la α -hélice siguiente. Al igual que la mayoría de las amino hidrolasas el sitio activo está localizado en el extremo C-terminal del barril (Figura 1.7.a)⁹⁴. Éste está compuesto de un núcleo doble de dos metales centrales ligados a residuos del extremo C-terminal del centro de las láminas- β , y el sitio de unión al sustrato está conformado por los loops que forman el extremo C-terminal con el fondo del barril⁹⁵. El ion metálico natural de la PTE es el Zn^{2+} , pero se ha evaluado su actividad con los cationes Cd^{2+} , Co^{2+} , Mn^{2+} , y Ni^{2+} observándose que conservaba su actividad pero con diferentes velocidades de reacción⁹⁶. La OPH es un dímero de dos estructuras idénticas de 336 aminoácidos y tiene un peso molecular de aproximadamente 72kDa. Es capaz de hidrolizar un amplio rango de OPs y puede clivar enlaces de tipo P-O, P-F y P-S pero con diferentes eficiencias¹¹.

- **Metil paratión hidrolasa (MPH)** está codificada en el gen *mpd* y se ha encontrado en numerosas bacterias no relacionadas filogenéticamente como en *Plesiomonas* sp⁹⁷, *Methylibium petroleiphilum*, *Azoarcus* sp, *Leptothrix cholodnii*, *Chromobacterium violaceum* y *Sinorhizobium meliloti*¹⁵. Éstas son muy activas frente al MP, no obstante, pueden hidrolizar otros compuestos OPs, pero con menor eficiencia. Su estructura cristalina ha sido resuelta⁹⁸, tiene un pliegue de β -lactamasa en lugar del pliegue de barril TIM. Cada monómero en la enzima dimérica se pliega como un sándwich $\alpha\beta / \beta\alpha$, típico del pliegue de β -lactamasa (Figura 1.7.b). A pesar de la secuencia diferente y el plegamiento de proteínas, el sitio activo de MPH comparte características comunes con la PTE⁹⁹.

- **Anhidrolasa Ácida de Organofosforados (OPAA)** la siguiente clase de enzimas está codificada por el gen *opaA* y fue aislada de *Alteromonas undina* y *Alteromonas haloplanktis*^{100, 101}. A diferencia del resto de las PTEs, la OPAA parece haber evolucionado de una proteasa y no de una lactonasa. Esta enzima pertenece a la familia de las dipeptidasas, posee una estructura oligomérica que comprende dos subunidades las cuales a su vez están formadas por dímeros. Cada sub-unidad de dímeros posee un dominio globular entorno a su N-terminal, y en su C-terminal se encuentra el centro binuclear que contiene los dos iones metálicos, esta posee naturalmente dos iones Mg^{2+} ¹⁰². La actividad originaria de la OPAA aparenta ser la degradación de los péptidos que contienen prolina generados durante la descomposición de

proteínas tipo colágeno. Se ha demostrado que esta enzima posee actividad prolidasa, con especificidad de dipéptidos que posean prolina como segundo residuo¹⁰³.

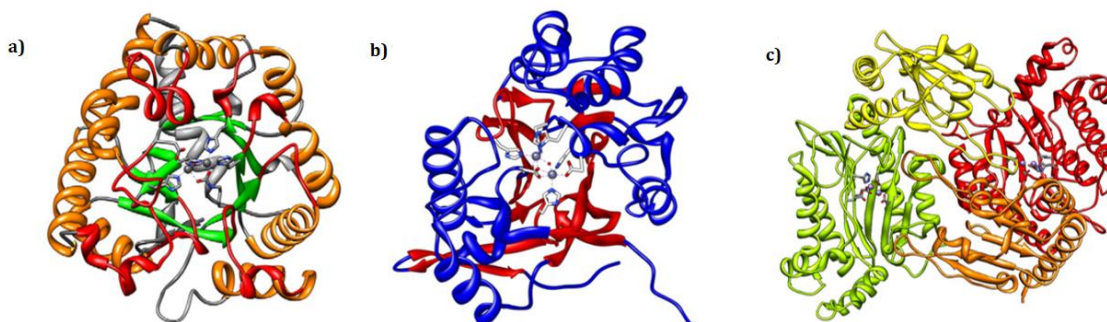


Figura 1.9. Estructura tridimensional: a) OPH b) MPH c) OPAA.

Dado que la población mundial está aumentando rápidamente, es probable que los OPs sigan siendo una parte esencial para que la agricultura resuelva el desafío de una demanda cada vez mayor de alimentos. Asimismo, y como ya se mencionó, los métodos tradicionales para el tratamiento de estos compuestos altamente tóxicos para mamíferos son costosos, y hasta pueden generar nuevos productos igual o más tóxicos. En consecuencia, la tensión sobre el medio ambiente y la salud pública aumentará, haciendo del desarrollo de herramientas eficientes para la biorremediación, una tarea de alta prioridad. Las enzimas que degradan OPs son la vía más prometedora disponible para esta tarea. El desafío es optimizar dichas enzimas para resistir las presiones del ambiente (es decir, la temperatura, el pH) y ser lo suficientemente versátiles como para operar en un rango de compuestos OP de uso común. Se han logrado avances significativos hacia estos objetivos utilizando varios métodos de mutagénesis y de tipo evolutivo^{104, 105}. De manera similar, los métodos óptimos para la inmovilización de estas enzimas todavía se están investigando, el objetivo es desarrollar catalizadores con las propiedades catalíticas deseadas que se puedan manejar de manera fácil y continua en un proceso de biorremediación.

En este sentido se han reportado diferentes sistemas para el tratamiento de ambientes contaminados, por ejemplo Caldwell et. Al¹⁰⁶ diseñó un sistema inmovilizando la PTE de *B. diminuta* en membranas de nylon lo que probó ser un método eficiente para la degradación de OPs en aguas. Del mismo modo, Gaoa et al.¹⁰⁷ han inmovilizado OPA recombinante en fibras de poliéster y fueron aplicadas a un reactor en continuo degradando 0,05 mM de MP en 2 h. Por su parte Mulbry et al.¹⁰⁸ desarrolló un biorreactor con un consorcio de microorganismos

capaces de degradar 15.000 L de CP en un solo batch, y dos de estas unidades se mantienen operativas en Estados Unidos desde 1996. Por su parte Khalid et al.¹⁰⁹ también emplearon un consorcio bacteriano, pero inmovilizado en perlas de alginato de calcio reforzadas con polisulfona como biocatalizador en un reactor tipo batch para la degradación de 1 mM de CPP en 18 h. También se ha reportado el empleo de microorganismos aislados de suelo inmovilizados en esponjas de poliuretano en reactores de lecho empaquetado para la degradación de CPP, como por ejemplo de una *Pseudomonas sp.* exhibiendo la degradación de 0,75 mM en 24 h¹¹⁰, mientras que Yadav et al.¹¹¹ reportaron el uso de *Aspergillus sp.* con el cual se degradó hasta 0,4 mM en 24 h.

1.5. NUCLEÓSIDOS NATURALES Y SUS ANÁLOGOS

Los nucleósidos y los nucleótidos son compuestos endógenos que participan en varios procesos celulares, como la síntesis de ADN y ARN, la señalización celular, la regulación de enzimas y el metabolismo. Éstos son glicosilaminas, que consisten en la unión de una base nitrogenada y un monosacárido de cinco carbonos (D-ribosa o D-2-desoxirribosa) a través de un enlace β -glicosídico. Las bases son compuestos derivados de los núcleos heterocíclicos pirimidina y purina. Cuando alguna de estas bases están unidas a la D-ribosa se forman las subunidades del ácido ribonucleico (ARN) y cuando lo están a la D-2-desoxirribosa forman parte del ácido desoxirribonucleico (ADN) (Figura 1.10).

Los análogos de nucleósidos (ANS) y nucleótidos (ANT) son compuestos sintéticos, modificados químicamente que se han desarrollado para imitar a sus contrapartes fisiológicas con el fin de explotar el metabolismo celular y posteriormente incorporarse al ADN y al ARN para inhibir la división celular y la replicación viral. La diversidad química de estos compuestos se basa en modificaciones como la halogenación, metilación, *N*-conjugación, saturación de enlaces C-C, hidroxilaciones, apertura del anillo correspondiente al azúcar, la protección por grupos polares y reemplazo del oxígeno por nitrógeno.

Los ANSs y ANTs terapéuticos utilizados actualmente explotan las mismas rutas metabólicas de los nucleósidos o nucleótidos endógenos, y también actúan como anti-metabolitos.

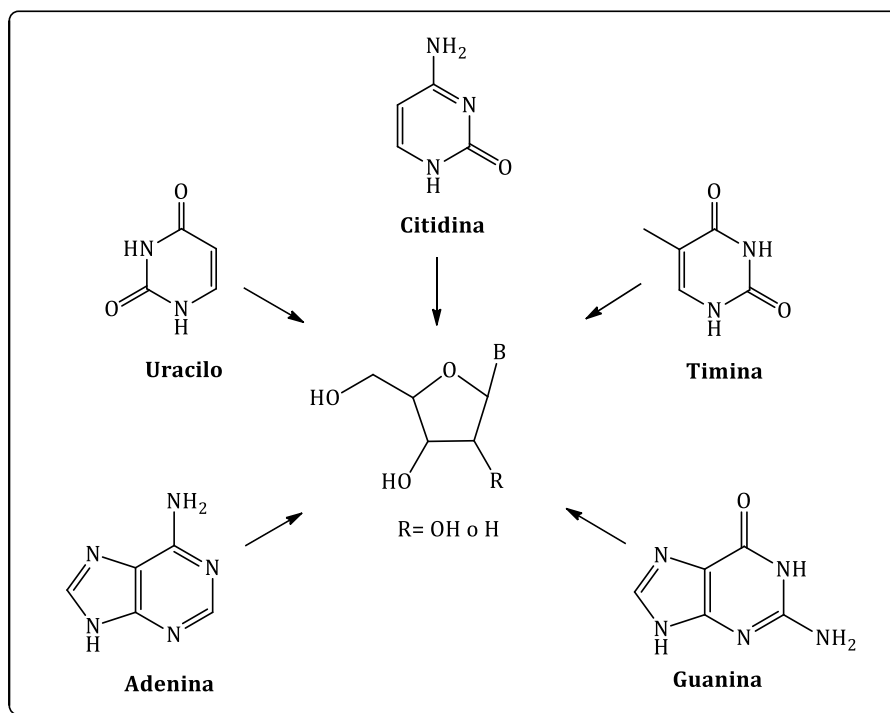


Figura 1.10. Nucleósidos naturales.

Estos análogos ingresan a las células a través de transportadores de nucleósidos específicos, y existe una creciente evidencia de que los transportadores de aniones orgánicos o catiónicos, así como los transportadores de péptidos, participan en la captación celular de ciertos análogos antivirales. Dentro de las células, los fármacos son posteriormente fosforilados por una nucleósido quinasa y una nucleósido monofosfato quinasa, y luego una nucleósido difosfato quinasa, creatina quinasa o 3-fosfoglicerato quinasa cataliza la última etapa de fosforilación (Figura 1.11.). Esto conduce a la acumulación de análogos de nucleósidos di- y trifosforilados en células infectadas con cáncer o virus. Esta acción tiene beneficios terapéuticos potenciales, por ejemplo, en la inhibición del crecimiento de células cancerosas, la inhibición de la replicación viral y otras indicaciones. Además de su incorporación a los ácidos nucleicos, los análogos de nucleósidos y nucleótidos pueden interactuar e inhibir enzimas esenciales como las polimerasas humanas y virales (es decir, polimerasas dependientes de ADN o ARN), quinasas, ribonucleótido reductasas, ADN metiltransferasas, purin y pirimidin nucleósido fosforilasas y timidilato sintetasas¹¹².

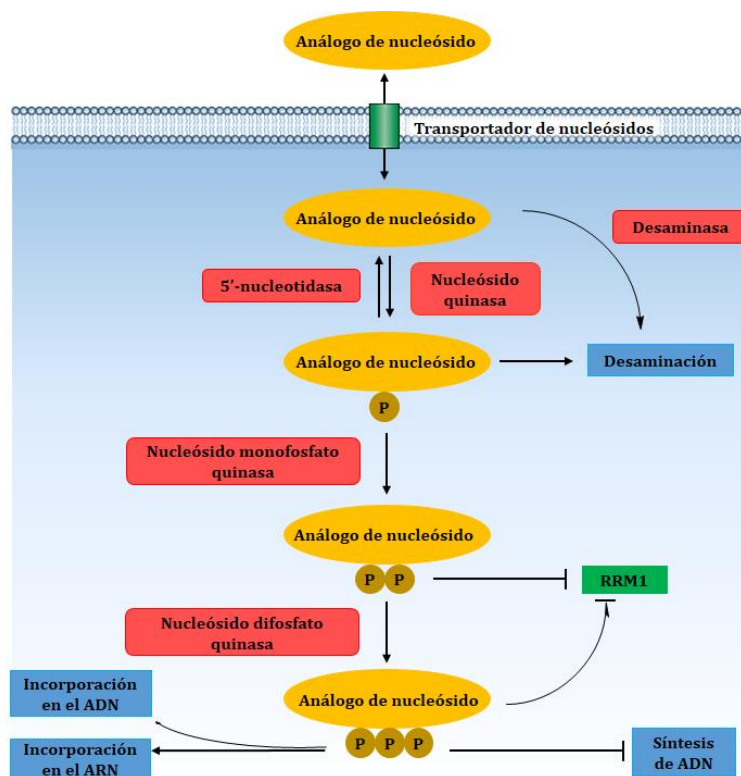


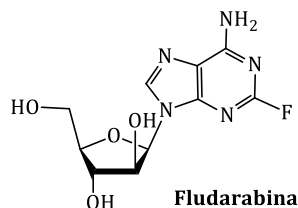
Figura 1.11. Mecanismo de acción de los análogos de nucleósidos¹¹².

1.5.1. Aplicaciones

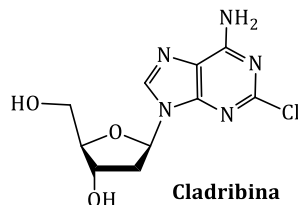
1.5.1.1. Anticancerígenos

Los ANSs con actividad antineoplásica actúan también como antimetabolitos, interactuando con la maquinaria encargada en la replicación de las células tumorales e interfiriendo con la síntesis de ADN, evitando de esta manera la división celular y por ende el crecimiento de los tumores. Debido a que la velocidad de replicación es mayor en células tumorales, la inhibición celular se produce principalmente en éstas. Los mecanismos de acción para estos análogos de nucleósidos son la activación de la apoptosis por activación de un grupo de proteínas denominadas caspasas y la activación de ciertos receptores que están involucrados en el inicio de la muerte celular. Asimismo, la incorporación de los análogos de nucleósidos en el ADN celular causa la ruptura de la hebra en fase S (sintética) desencadenando la apoptosis. Adicionalmente también inhiben las enzimas involucradas en la biosíntesis de nucleósidos purínicos y pirimidínicos. En la tabla 1.3. se citan algunos ejemplos de ANSs aplicados al tratamiento de algún tipo de cáncer y sus usos.

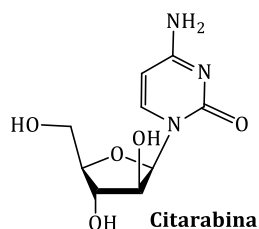
Análogo de nucleósido**Mecanismo de acción y aplicación**



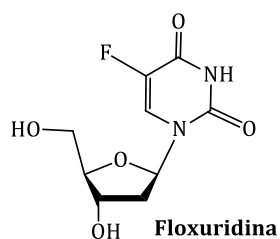
La *fludarabina* es un análogo arabinósido fosforilado de la adenosina, sustituido en la posición 2 de la base por un flúor. Inhibe la síntesis de ADN interfiriendo con enzimas como la ribonucleótido reductasa y la ADN polimerasa, entre otras.



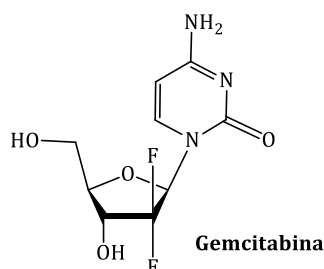
La *cladribina* es un análogo de la desoxiadenosina, en el cual la base se encuentra sustituida en la posición 2 por un cloro. Es indicada en pacientes con leucemia linfocítica. Posee efectos inmunosupresores, e inhibe la adenosindeaminasa, lo cual interfiere con la habilidad de la célula de procesar ADN.



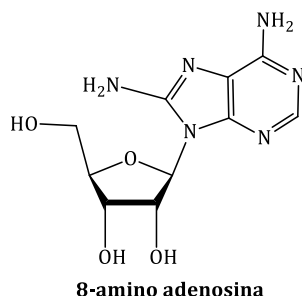
La *citarabina* (AraC) es un análogo modificado en el azúcar, en el cual la ribosa ha sido reemplazada por arabinosa. Este compuesto daña el ADN en su fase sintética. A su vez, inhibe tanto la ADN como la ARN polimerasas y la enzima nucleótido reductasa, necesarias para la síntesis de ADN. Es administrada en pacientes con leucemia linfocítica.



La *floxuridina* es un análogo pirimidínico, en el cual la base se encuentra sustituida en la posición 5 por un flúor. La forma activa es la base fluorada que es liberada enzimáticamente en el cuerpo. Este compuesto principalmente actúa como inhibidor de la timidilato sintetasa. Esta inhibición bloquea la síntesis de timidina, requerida para la replicación del ADN. Es indicado en el tratamiento de cáncer gastrointestinal.



La *gemcitabina*, un derivado de nucleósido pirimidina bifluorado, con actividad citotóxica por inhibición de la síntesis de ADN, lo que parece inducir el proceso de muerte celular. Tiene actividad en tumores malignos hematológicos y contra varios tumores sólidos.



La 8-amino-adenosina induce una disminución en la síntesis tanto de ARN como de ADN. La inducción de la citotoxicidad está relacionada con la disminución de la expresión MET en células de mieloma múltiple y la expresión reducida de ciclina E en células de cáncer de mama.

Tabla1.3. Anticancerígenos, estructura química de los análogos de nucleósidos, modo de acción y usos^{113, 114}.

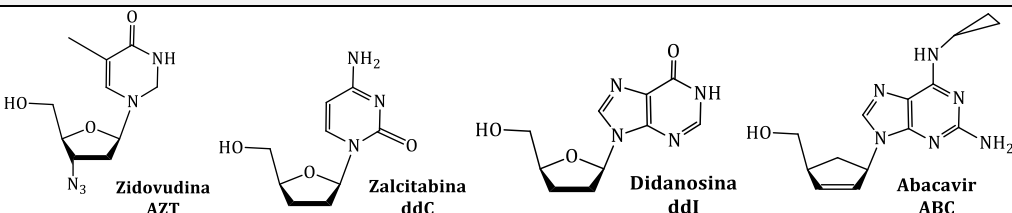
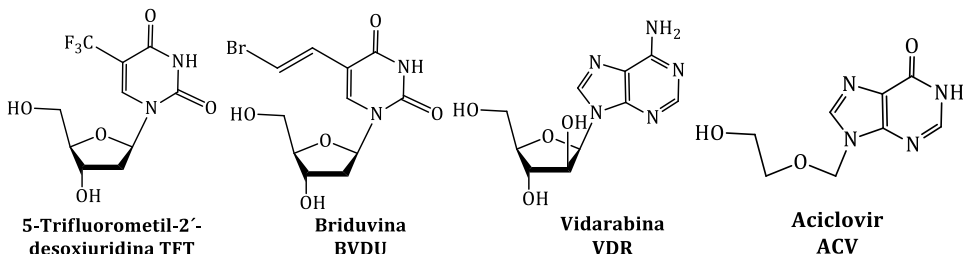
1.5.1.2. Antivirales

El desarrollo de fármacos antivirales ha comenzado desde que se aprobó la primera droga antiviral, idoxuridina, en junio de 1963. Desde entonces, se han desarrollado muchos medicamentos antivirales. Entre junio de 1963 y abril de 2016, se aprobaron formalmente 90 medicamentos para tratar 9 enfermedades infecciosas humanas a pesar del hecho de que se han propuesto en literatura miles de inhibidores antivirales.

Se pueden mencionar nueve virus humanos, *virus de ADN*: Virus de Hepatitis B (VHB), Citomegalovirus (VCMH), Virus del Herpes simple (VHS), Virus del Papiloma Humano (VPH) y Virus de Varicela Zoster (VZV). *Virus de ARN*: Virus de Hepatitis C (VHC), Virus Sincicial Respiratorio (VRS) y Virus de la influenza. *Retrovirus*: Virus de la Inmunodeficiencia Humana (VIH). Curiosamente, 11 de los 90 medicamentos antivirales, han sido aprobados para el tratamiento de más de una enfermedad infecciosa, lo que sugiere que los medicamentos antivirales pueden tratar infecciones virales múltiples. Por ejemplo, la ribavirina, es eficaz contra tres virus de ARN: VHC, VRS y virus de la influenza. Más importante aún, los medicamentos antivirales del mismo grupo comparten mecanismos similares de acción farmacológica para inhibir la replicación viral durante el ciclo de vida del mismo¹¹⁵. Cuando se analizan las posibilidades quimioterapéuticas antivirales, la mejor guía es el ciclo de replicación viral, el cual puede dividirse en varios pasos: primero el virus se une a la superficie de la célula huésped. El material genético del virus utiliza los mecanismos bioquímicos de la célula huésped para replicar su material genético; estos pasos de replicación son diferentes en los virus de ARN o ADN, pero el ácido ribonucleico mensajero (ARNm) es producido en ambos. Entonces el material genético viral es encapsulado y las nuevas partículas salen de la célula huésped. Si bien todos los virus siguen un ciclo de

replicación, éste puede variar considerablemente de una familia de virus a otra. Por lo general los inhibidores son específicos para una familia de virus y en algunos casos para algún miembro en particular de esa familia. De esta forma, el ciclo reproductivo de los virus está íntimamente conectado a la célula que ataca, por lo que un agente antiviral efectivo debe afectar las enzimas relacionadas con el virus sin alterar las funciones celulares del huésped.

Como bien se mencionó se cuenta con una amplia cantidad de análogos de nucleósidos utilizados en terapias antivirales, algunos ejemplos de ellos se mencionarán en la tabla 1.4.

Retrovirus	
VIH	
Antivirales	 <p>Zidovudina AZT</p> <p>Zalcitabina ddC</p> <p>Didanosina ddI</p> <p>Abacavir ABC</p>
Modo de acción	Actúan sobre la transcriptasa reversa del VIH y cumplen la función de terminador de la reacción, compitiendo con sus derivados 5'-trifosfato para así inhibir la síntesis de ADN.
Virus de ADN	
VSH - VZV	
Antivirales	 <p>5-Trifluorometil-2'-desoxiuridina TFT</p> <p>Brividina BVDU</p> <p>Vidarabina VDR</p> <p>Aciclovir ACV</p>
Modo de acción	TFT inhibe la replicación del ADN y ha sido utilizada en usos tópicos para infecciones herpéticas oculares, mientras que BVDU, VDR y ACV son los inhibidores del virus del herpes y del virus de la varicela zoster. El mecanismo de acción de estos compuestos involucra su fosforilación preferencial por las quinasas virales y una vez formados los correspondientes trifosfatos, inhiben la ADN polimerasa o sirven como sustratos para ser incorporados al ADN viral.

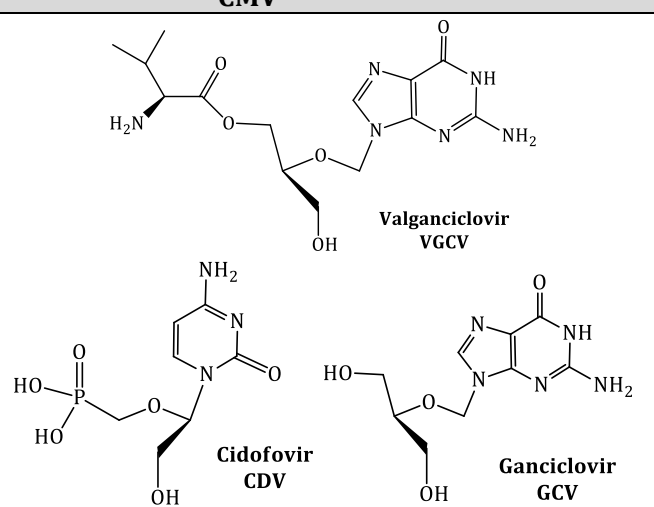
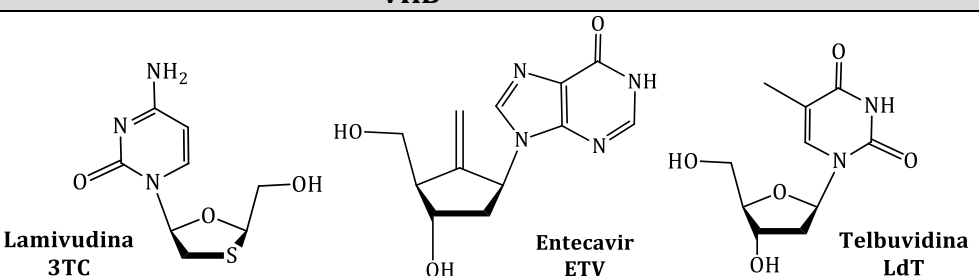
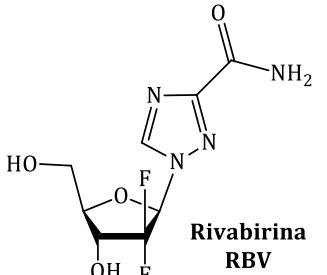
CMV	
Antivirales	 <p>Valganciclovir VGCV</p> <p>Cidofovir CDV</p> <p>Ganciclovir GCV</p>
Modo de acción	Inhiben la DNA polimerasa. VGCV es utilizado en el tratamiento de infección por CMV que puede ocurrir después de un trasplante, GCV es utilizado en el tratamiento de la retinitis en pacientes con SIDA. Por su parte CDV es empleada en retinitis cuando los pacientes muestran resistencia a ganciclovir y foscarnet.
VHB	
Antivirales	 <p>Lamivudina 3TC</p> <p>Entecavir ETV</p> <p>Telbivudina LdT</p>
Modo de acción	Inhiben la síntesis de DNA, están indicados para el tratamiento de Hepatitis B.
Virus de ARN	
VHC, VRS y Virus de la Influenza	
Antivirales	 <p>Rivabirina RBV</p>
Modo de acción	La acción antiviral de RBV está correlacionada con la inhibición de la enzima inosina monofosfato deshidrogenasa, lo que conlleva a una falta de guanosina 5'-trifosfato (GTP) celular, lo que potencia la acción de 5'-trifosfato de ribavirina en la inhibición de la RNA polimerasa viral. Su mayor potencial clínico es en el tratamiento de enfermedades respiratorias como la influenza A o B y otras infecciones producidas por el virus de la fiebre hemorrágica.

Tabla 1.4. Antivirales, estructura química de los análogos de nucleósidos, modo de acción y usos¹¹³.

1.5.2. Pronucleótidos

En el diseño de nucleósidos activos farmacológicamente no solo debe tenerse en cuenta los requerimientos estructurales necesarios para la interacción con las correspondientes polimerasas y quinasas. Sino también, deben abordarse ciertas desventajas que presentan los nucleósidos como su baja biodisponibilidad y su rápido catabolismo a derivados inactivos.

Como ya se ha mencionado, las especies que interfieren con las polimerasas son los nucleósidos trifosfatos, pero el eficiente anabolismo de esos compuestos es frecuentemente obstaculizado por el primer paso de fosforilación mediado por quinasas virales o celulares, que da origen a los correspondiente nucleósidos monofosfatos (NMPs). Esta etapa es específica y usualmente puede llevar al desarrollo de resistencia¹¹⁶. A fin de sortear el paso limitante de fosforilación de los análogos nucleosídicos y evitar el desarrollo de resistencia a estas drogas vinculadas a este proceso, sería deseable poder realizar la administración directa de los monofosfatos de dichos compuestos. Sin embargo, esta estrategia no es viable debido a su estructura iónica. Por ello, una estrategia que se presenta como alternativa es el uso de **pronucleótidos**, éstos son ANS fosforilados en los que el grupo fosfato ha sido enmascarado para aumentar la hidrofobicidad y permitir la entrada del compuesto en la célula. La diversidad química de los pronucleótidos depende del tipo de nucleósido así como de las máscaras químicas, que pueden ser iguales (llamados compuestos simétricos) o diferentes (llamados compuestos asimétricos) y pueden estar vinculados por un enlace fósforo-oxígeno (conocido como fosfoésteres) o un enlace de fósforo-nitrógeno (conocido como fosforamidatos). Los pronucleótidos son insensibles a la desaminación extracelular e intracelular, entran en las células independientemente de los transportadores de membrana, liberan nucleósidos fosforilados y ANS dentro de las células, en consecuencia resultan ser independientes de las nucleósido quinasas^{117,118}.

El concepto pronucleótido se presentó por primera vez en 1982 con la descripción del arabinósido citidina- 5'-monofosfato (Ara-CMP) ¹¹⁹. La eficacia clínica de este enfoque fue confirmada por la aprobación de la FDA de los pronucleótidos antivirales Tenofovir disoproxil y Adefovir dipivoxil. Por su parte también se han evaluado los ésteres de ditioetilo, S-acil-2-tioetilo (SATE), aciloximetilo, aciloxibenzilo, amidatos de ésteres metílicos de aminoácidos y fosfatos cíclicos, entre otros¹²⁰. Dichas síntesis reportadas se llevaron a cabo por medios químicos. El bis(S-pivaloil-2-tioetil)-5'-fosfotriéster de AraC fue sintetizado como prodroga de AraCMP¹²¹ mientras que diversos dialquilfosfatos de 2',3'-didesoxi-3-deazaadenosina

demonstraron tener mejores propiedades anti-HIV que el correspondiente nucleósido, a mayor lipofilicidad del derivado¹²².

En este marco, los pronucleótidos constituyen una familia de rápido crecimiento de derivados de análogos de nucleósidos que tienen un gran potencial para la actividad en cepas resistentes a fármacos de enfermedades infecciosas en comparación con análogos de nucleósidos y nucleótidos convencionales. Resulta de suma importancia generar nuevas metodologías experimentales y enfoques quimiosintéticos que faciliten la obtención de este tipo de compuestos, siendo la biocatálisis aplicada una herramienta prometedora.

BIBLIOGRAFÍA

1. Sheldon RA, Pereira PC. Biocatalysis engineering: the big picture. *Chem Soc Rev* 2017; **46**: 2678-2691.
2. Grogan G. (2009) *Practical biotransformation*. United Kingdom. Wiley.
3. Sheldon RA, Woodley JM. Role of Biocatalysis in Sustainable Chemistry. *Chem Rev* 2018; **118**: 801–838.
4. Kulkarni G (2002) *Biotechnology and its application in pharmacy*. Jaypee Brothers.
5. Cao L. (2006) *Carrier-bound Immobilized Enzymes: Principles, Application and Design*. Germany. Wiley-VCH.
6. Eş I, Gonçalves Vieira JD & Corrêa Amaral A. Principles, techniques, and applications of biocatalyst immobilization for industrial application. *Appl Microbiol Biotechnol* 2015; **99(5)**:2065-2082.
7. Nisha S, Arun Karthick S and Gobi N. A Review on Methods, Application and Properties of Immobilized Enzyme *Che Sci Rev Lett* 2012; **1(3)**: 148-155.
8. Polakovic M, Svitel J, Bucko M, Filip J, Nedela V, Ansorge-Schumacher MB, Gemeiner P. Progress in biocatalysis with immobilized viable whole cells: systems development, reaction engineering and applications. *Biotechnol Lett* 2017; **39(5)**:667-683.
9. Doran PM (1995) *Reaction & Reactors. Bioprocess Engineering Principles*. A. P. Ltd. London, Acribia.
10. Karigar CS and Rao SS. Role of Microbial Enzymes in the Bioremediation of Pollutants: A Review. *Enzyme Research* 2011; **2011**. doi:10.4061/2011/805187.
11. Niti C, Sunita S, Kamlesh K et al. Bioremediation: An emerging technology for remediation of pesticides. *Res J Chem Environ* 2013; **14**: 88–104.
12. Kumar A, Bisht BS, Joshi VD, Dhewa T. Review on Bioremediation of Polluted Environment: A Management Tool. *Inter J Environ Sci* 2011; **1(6)**: 1079-1093.
13. Sharma B, Kumar Dangi A, Shukla P. Contemporary enzyme based technologies for bioremediation: A review. *J Environ Manage* 2018; **210**: 10-22.
14. Lin R, Wu R, Huang X, Xie T. Immobilization of oxalate decarboxylase to Eupergit and properties of the immobilized enzyme. *Prep Biochem Biotechnol* 2011; **41(2)**:154–165.

15. Zhai R, Zhang B, Wan Y, Li C, Wang J, Liu J Chitosan–halloysite hybrid-nanotubes: horseradish peroxidase immobilization and applications in phenol removal. *Chem Eng J* 2013; **214**: 304–309.
16. Gaoa Y, Truonga YB, Cacioli P, Butlerb P, Kyratzisa IL. Bioremediation of pesticide contaminated water using an organophosphate degrading enzyme immobilized on nonwoven polyester textiles. *Enzyme Microbiol Technol* 2014; **54**: 38– 44.
17. Jogdand VG, Chavan PA, Ghogare PD, Jadhav AG. Remediation of textile industry waste water using immobilized *Aspergillus terreus*. *Eur J Exp Biol* 2012; **2(5)**:1550–1555.
18. Singh BK, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol Rev* 2006; **30**:428-471.
19. Davis CS, Richardson RJ (1980). Organophosphorus compounds. In: Spencer, P.S., Schaumburg, H.H. (Eds.), Experimental and Clinical Neurotoxicology. Williams and Wilkins, Baltimore, MD.
20. Bigley AN & Raushel FM. Catalytic mechanisms for phosphotriesterases. *Biochim et Biophys Acta* 2013; **1834**: 443-453.
21. Sorgob MA, Vilanova E, Carrera V. Future applications of phosphotriesterase in prophylaxis and treatment of organophosphorus insecticide and nerve agent poisonings. *Toxicol Lett* 2004; **151**: 219-233.
22. Singh BK. Organophosphorus-degrading bacteria: ecology and industrial applications. *Nat Rev Microbiol* 2009; **7**:156-164.
23. Ahn JH, Lee SE, Kim SJ, You J, Han BH, Weon HY, Lee SW. Biodegradation of organophosphorus insecticides with P-S bonds by two *Sphingobium sp.* strain. *Int Biodeterior Biodegradation* 2018; **132**: 59–65.
24. Rignarsdottir KV. Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. *J Geol Soc* 2000; **157**: 859-876.
25. Alejo-González K, Hanson-Viana E, Vazquez-Duhalt R. Enzymatic detoxification of organophosphorus pesticides and related toxicants. *J Pestic Sci* 2018; **43(1)**: 1–9.
26. Casida JE. Organophosphorus Xenobiotic Toxicology. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 2017; **57**:309–27.

27. George N, Chauhan PS, Sondhi S, Saini S, Puri N, Gupta N. Biodegradation and analytical methods for detection of organophosphorous pesticide: chlorpyrifos. *Int J Pure Appl Sci Tech* 2014; **20(2)**:79.
28. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>
29. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/paraoxon#section=Top>
30. Butler AM, Murray M. Biotransformation of parathion in human liver: participation of CYP3A4 and its inactivation during microsomal parathion oxidation. *J Pharmacol Exp Ther* 1997; **280(2)**: 966-73.
31. Extoxnet Extension Toxicology Network Pesticide Information Profiles. 1996. URL: <http://extoxnet.orst.edu/pips/methylpa.htm>
32. Wasley A, Lepine LA, Jenkins R, Rubin C. An investigation of unexplained infant deaths in houses contaminated with methyl parathion. *Environ Health Perspect* 2002; **110(6)**:1053 - 1056.
33. Jaga K, Dharmani C. Methyl parathion: an organophosphate insecticide not quite forgotten. *Rev Environ Health* 2006; **21(1)**: 57-68.
34. U.S. Department of Health and Human Services. Public Health Service. Agency for Toxic Substances and Disease Registry. Toxicological Profile for Methyl Parathion, 2001.
35. Sapbamrer R, Hongsibsong S. Organophosphorus pesticide residues in vegetables from farms, markets, and a supermarket around Kwan Phayao Lake of Northern Thailand. *Arch Environ Contam Toxicol* 2014; **67(1)**: 60-67.
36. Srivastava S, Narvi SS, Prasad SC. Levels of select organophosphates in human colostrum and mature milk samples in rural region of Faizabad district, Uttar Pradesh, India. *Hum Exp Toxicol* 2011; **30(10)**:1458-1463.
37. Mallatou H, Pappas CP, Kondyli E, Albanis, TA. Pesticide residues in milk and cheeses from Greece. *Sci Total Environ* 1997; **196(2)**, 111-117.
38. Melgar MJ, Santaefemia M, Garcia MA. Organophosphorus pesticide residues in raw milk and infant formulas from Spanish northwest. *J Environ Sci Health B* 2010; **45(7)**: 595-600.

39. Petroianu GA, Nurulain SM, Nagelkerke N, Shafiullah M, Kassa J, Kuča K. Fiven oximes (K-27, K-48, obidoxime, HI-6 and trimedoxime) in comparison with pralidoxime: survival in rats exposed to methyl-paraoxon. *J Appl Toxicol* 2007; **27(5)**: 453-457.
40. Gotthard G, Hiblot J, Gonzalez D, Elias M, Chabriere E. Structural and Enzymatic Characterization of the Phosphotriesterase OPHC2 from *Pseudomonas pseudoalcaligenes*. *PLOS ONE* 2013; 8 (11).
41. Hollingworth RM, Alstott RL, Litzenberg RD. Glutathione S-aryl transferase in the metabolism of parathion and its analogs. *Life Sci* 1973; **13(3)**: 191-199.
42. Nair R, Singh VJ, Salian SR, Kalthur SG, D'Souza AS, Shetty PK, Adiga SK. Methyl parathion inhibits the nuclear maturation, decreases the cytoplasmic quality in oocytes and alters the developmental potential of embryos of Swiss albino mice. *Toxicol Appl Pharm* 2014; **279(3)**: 338-350.
43. Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, Bairy LK, D'Souza UJ. An organophosphate insecticide methyl parathion (o-o-dimethyl o-4-nitrophenyl phosphorothioate) induces cytotoxic damage and tubular atrophy in the testis despite elevated testosterone level in the rat. *J Toxicol Sci* 2006; **31(3)**: 177-189.
44. Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, Kumar SG, Kumar HHC, Bairy KL, D'Souza UJ. A broad-spectrum organophosphate pesticide O, O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate (methyl parathion) adversely affects the structure and function of male accessory reproductive organs in the rat. *Environ Toxicol Pharm* 2006; **22(3)**: 315-324.
45. Narayana K, Prashanthi N, Nayanatara A, Kumar HHC, Abhilash K, & Bairy KL. Effects of methyl parathion (O,O-dimethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate) on rat sperm morphology and sperm count, but not fertility, are associated with decreased ascorbic acid level in the testis. *Mutat Res Gen Toxicol Environ Mutagen* 2005; **588(1)**, 28-34.
46. Mathew G, Vijayalaxmi KK, Rahiman MA. Methyl parathion-induced sperm shape abnormalities in mouse. *Mutat Res Gen Toxicol* 1992; **280(3)**, 169-173.
47. Sánchez Gutiérrez M. Methyl-parathion decreases sperm function and fertilization capacity after targeting spermatocytes and maturing spermatozoa *Toxicol Appl Pharmacol* 2009; **238(2)**: 141-9.

48. Güney M, Oral B, Demirin H, Özgüner M, Take G, Mungan T, Altuntas, I. Evaluation of caspase-dependent apoptosis during methyl parathion-induced endometrial damage in rats: Ameliorating effect of Vitamins E and C. *Environ Toxicol Pharm* 2007; **23**(2): 221-227.
49. Crowder LA, Lanzaro GC, Whitson RS. Behavioral effects of methyl parathion and toxaphene exposure in rats. *J Environ Sci Health B* 1980; **15**(4): 365-378.
50. Kochansky J. Synthesis of (Diethyl-d 10) Coumaphos and Related Compounds. *J Agr and Food Chem* 2000; **48**(7): 2826-2828.
51. Kearney PC, Karns JS, Muldoon MT, Ruth JM. Coumaphos disposal by combined microbial and UVozonation reactions. *J Agr Food Chem* 1986; **34**: 702–706
52. Al Naggar Y, Codling G, Vogt A, Naiem E, Mona M, Seif A, Giesy JP. Organophosphorus insecticides in honey, pollen and bees (*Apis mellifera* L.) and their potential hazard to bee colonies in Egypt. *Ecotoxicol Environ Safety* 2015; **114**: 1–8.
53. Shelton DR & Somich CJ. Isolation and characterization of coumaphos-metabolising bacteria from cattle dip. *Appl Environ Microbiol* 1988; **54**: 2566–2571.
54. Mulbry WW, Ahrens E, Karns JS. Use of a field-scale biofilter for the degradation of the organophosphate insecticide coumaphos in cattle dip wastes. *Pestic Sci* 1998; **52**: 268–274.
55. Mulbry WW, Del Valle PL, Karns JS. Biodegradation of the organophosphate insecticide coumaphos in highly contaminated soils and in liquid wastes. *Pestic Sci* 1996; **48**: 149–155.
56. Briseno-Roa L, Hill J, Notman S, Sellers D, Smith AP, Timperley CM, Griffiths AD. Analogues with fluorescent leaving groups for screening and selection of enzymes that efficiently hydrolyze organophosphorus nerve agents. *J Med Chem* 2006; **49**(1): 246-255.
57. Santillan JY, Dettorre LA, Lewkowicz ES, Iribarren AM. New and highly active microbial phosphotriesterase sources. *FEMS Microbiol Lett* 2016; **363**: doi: 10.1093/femsle/fnw276.

58. Kumar S, Kaushik G, Dar MA, Nimesh S, Lopez-Chuken UJ, Villarreal-Chiu JF. Microbial Degradation of Organophosphate Pesticides: A Review. *Pedosphere* 2018; **28(2)**: 190–208.
59. Somia El-M, Madiha F. Pathological effects of dichlorvos and fenitrothion in mice. *Pathol Res Pract* 2012; **208**: 286–291.
60. Evgenidou E, Konstantinou I, Fytianos K, Albanis T. Study of the removal of dichlorvos and dimethoate in a titanium dioxide mediated photocatalytic process through the examination of intermediates and the reaction mechanism. *J Hazard Mater* 2006; **137(2)**: 1056-1064.
61. Oncescu T, Oancea P, Enache M, Popescu G, Dumitru L, Kamekura M. Halophilic bacteria are able to decontaminate dichlorvos, a pesticide, from saline environments Central European. *J Biol* 2007; **2(4)**: 563–573.
62. World Health Organization (WHO). The WHO Recommended Classification of Pesticides by Hazard and Guidelines to Classification. WHO, Geneva. 2009.
63. Wang S, Xiang B, Su Y, Tan Q. Direct determination of dichlorvos in water by partial least square-discriminant analysis. *Environ Chem Lett* 2012; **10**:383–387.
64. International Agency for Research on Cancer – IARC. Monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans: occupational exposures in insecticide application, and some pesticides: dichlorvos. Geneva: UN World Health Organization. 1991; **53**.
65. John EM, Shaik JM. Chlorpyrifos pollution and remediation. *Environ Chem Lett* 2015; **13**:269–291.
66. Heshmati A, Nazemi F. Dichlorvos (DDVP) residue removal from tomato by washing with tap and ozone water, a commercial detergent solution and ultrasonic cleaner. *Food Sci Technol*, 2018; **38(3)**: 441-446.
67. Zia C, Sarfraz H, Khaliq RA, Azeem K, Muhammad A. Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. *J Environ Manage* 2013; **114**: 372-380.
68. Furlong CE, Holland N, Richter RJ, Bradman A, Ho A, Eskenazi B. PON1 status of farmworker mothers and children as a predictor of organophosphate sensitivity. *Pharmacogenet Genomic* 2006; **16**:183-190.

69. Rauh V, Arunajadai S, Horton M, Perera F, Hoepner L, Barr DB, Whyatt R. 7-Year neuro developmental scores and prenatal exposure to chlorpyrifos, a common agricultural pesticide. *Environ Health Perspect* 2011; **119**:1196-1201.
70. Supreeth M, Raju NS. Biotransformation of chlorpyrifos and endosulfan by bacteria and fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017; **101(15)**: 5961-5971.
71. De Gerónimo E, Aparicio VC, Bárbaro S, Portocarrero R, Jaime S, Costa JL. Presence of pesticides in surface water from four sub-basins in Argentina. *Chemosphere* 2014; **107**:423-431.
72. CASAFE (Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes). Mercado Argentino 2013 de Productos Fitosanitarios. 2013. <http://www.casafe.org/>
73. Chawla P, Kaushik R, Swaraj VJS, Kumar N. Organophosphorus pesticides residues in food and their colorimetric detection *Environ Nanotech, Monitoring Manage* 2018; **10**: 292-307.
74. Antolini L, Eandi M, Gieco M, Filippi I, Ortiz P, Díaz MP. Valoración de la exposición a plaguicidas en cultivos extensivos de la Argentina y su potencial impacto sobre la salud. Comisión Nacional Salud Investiga. Ministerio de Salud de la Nación, 2015.
75. Pórfido OD. Los plaguicidas en la República Argentina. Departamento de Salud Ambiental. Dirección Nacional de Determinantes de la Salud e Investigación. Ministerio de Salud de la Nación, 2013.
76. Laborde A et al. Children's Health in Latin America: The Influence of Environmental Exposures. *Environ Health Persp* 2015; **123(3)**:201-209.
77. Philpott T. Argentina Is Using More Pesticide Than Ever Before. And Now It Has Cancer Clusters. Mother Jones, 2013, www.motherjones.com/tomphilpott/2013/10/argentina-cancer-cluster-pesticide. Accessed 6 Apr. 2016.
78. Grossman E. A Town Demands Protection from Pesticides. *National Geographic News and Latest Stories* 2016, news.nationalgeographic.com/2016/02/160223-photograph-aixa-argentina-avia-terai-pesticides-glyphosate/.
79. Pimentel D, Burgess M. Soil Erosion Threatens Food Production. *Agriculture* 2013; **3(3)**: 443-463.

80. Aparicio V, De Gerónimo E, Hernández Guijarro K, Pérez D, Portocarrero R, Vidal C. (2015) *Los plaguicidas agregados al suelo y su destino en el ambiente*. 1a ed. Balcarce, Buenos Aires; Famaillá, Tucumán; Reconquista, Santa Fe.
81. Sarich C. 75% of Air and Rain Samples Contain Monsanto's Round Up. *Natural Society* 2015, naturalsociety.com/75-air-rain-samples-contain-monsantos-round/.
82. Cámara de Sanidad Agropecuaria y Fertilizantes (CASAFE). Estadísticas. <http://www.casafe.org/biblioteca/estadisticas>.
83. Aguirre RE. Agroquímicos en la provincia del Chaco. IV congreso nacional de derecho agrario provincial salta. 1 y 2 de junio de 2017.
84. Vilanova E, Sogorb MA, The role of phosphotriesterases in the detoxication of organophosphorus compounds. *Crit Rev Toxicol* 1999; **29(1)**: 21-57.
85. Lewis VE, Donarski WJ, Wild JR, Raushel FM. Mechanism and stereochemical course at phosphorus of the reaction catalyzed by a bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry* 1988; **27(5)**: 1591-1597.
86. Sogorb MA, Pla A, Vilanova, E. Las esterasas que hidrolizan compuestos organofosforados: un mecanismo eficaz de destoxificación. *Rev Toxicol* 1996; **13**: 43-48.
87. Sethunathan N, Yoshida T. A Flavobacterium sp. that degrades diazinon and parathion. *Canadian J Microbiol* 1973; **19(7)**: 873-875.
88. Bird SB, Sutherland TD, Gresham C, Oakeshott J, Scott C, Eddleston M. OpdA, a bacterial organophosphorus hydrolase, prevents lethality in rats after poisoning with highly toxic organophosphorus pesticides. *Toxicol* 2008; **247(2)**: 88-92.
89. Afriat L, Roodveldt C, Manco G, Tawfik DS. The latent promiscuity of newly identified microbial lactonases is linked to a recently diverged phosphotriesterase. *Biochemistry* 2006; **45(46)**: 13677-1368.
90. Manco G, Porzio E, Suzumoto Y. Enzymatic detoxification: a sustainable means of degrading toxic organophosphate pesticides and chemical warfare nerve agents. *J Chem Technol Biotech* 2018; **93(8)**: 2064-2082.
91. Siddavattam D, Khajamohiddin S, Manavathi B, Pakala SB, Merrick M. Transposon-like organization of the plasmid-borne organophosphate degradation (opd) gene cluster found in Flavobacterium sp. *Appl Environ Microbiol* 2003; **69(5)**: 2533-2539.

92. Mulbry WW, Karns JS. Parathion hydrolase specified by the *Flavobacterium* opd gene: relationship between the gene and protein. *J Bacteriol* 1989; **171(12)**: 6740-6746.
93. Horne I, Sutherland TD, Harcourt RL, Russell RJ, Oakeshott JG. Identification of an opd (organophosphate degradation) gene in an *Agrobacterium* isolate. *Appl Environ Microbiol*, 2002; **68(7)**:3371-3376.
94. Benning MM, Kuo JM, Raushel FM, Holden HM. Three-dimensional structure of the binuclear metal center of phosphotriesterase. *Biochemistry* 1995; **34(25)**: 7973-7978.
95. Omburo GA, Mullins LS, Raushel FM. Structural characterization of the divalent cation sites of bacterial phosphotriesterase by cadmium-113 NMR spectroscopy. *Biochemistry* 1993; **32(35)**: 9148-9155.
96. Omburo GA, Kuo JM, Mullins LS, Raushel FM. Characterization of the zinc binding site of bacterial phosphotriesterase. *J Biol Chem* 1992; **267(19)**: 13278-13283.
97. Yang C, Liu N, Guo X, Qiao C. Cloning of mpd gene from a chlorpyrifos-degrading bacterium and use of this strain in bioremediation of contaminated soil. *FEMS microbiol lett* 2006; **265(1)**: 118-125.
98. Dong YJ, Bartlam M, Sun L, Zhou YF, Zhang ZP, Zhang CG, Zhang XE. Crystal structure of methyl parathion hydrolase from *Pseudomonas* sp. WBC-3. *J Mol Biol* 2005; **353(3)**: 655-663.
99. Bigley AN, Raushel FM. Catalytic mechanisms for Phosphotriesterases. *Biochim Biophys Acta* 2013; **1834**: 443-453.
100. Cheng TC, Harvey SP, Stroup AN. Purification and properties of a highly active organophosphorus acid anhydrolase from *Alteromonas undina*. *Appl Environ Microbiol* 1993; **59(9)**: 3138-3140.
101. Cheng TC, De Frank JJ, Rastogi VK. *Alteromonas* prolidase for organophosphorus G-agent decontamination. *Chem Biol Interact* 1999; **119**: 455-462.
102. Vyas NK, Nickitenko A, Rastogi VK, Shah S, Quiocho FA. Structural insights into the dual activities of the nerve agent degrading organophosphate anhydrolase/prolidase. *Biochemistry* 2010; **49(3)**: 547-559.

103. Cheng TC, Liu L, Wang B, Wu J, De Frank JJ, Anderson DM, Hamilton AB. Nucleotide sequence of a gene encoding an organophosphorus nerve agent degrading enzyme from *Alteromonas haloplanktis*. *J Ind Microbiol Biotechnol* 1997; **18(1)**: 49-55.
104. Iyer R, Iken B. Protein engineering of representative hydrolytic enzymes for remediation of organophosphates. *Biochem Eng J* 2015; **94**: 134–144.
105. Wu P, Zhang Y, Chen Z, Wang Y, Zhu F, Cao B, Wu Y, Li N, The organophosphorus pesticides in soil was degraded by *Rhodobacter sphaeroides* after wastewater treatment. *Biochem Eng J* (2018) <https://doi.org/10.1016/j.bej.2018.07.019>
106. Caldwell SR, Raushel FM. Detoxification of organophosphate pesticides using a nylon based immobilized phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Appl Biochem Biotechnol* 1991; **31(1)**: 59-73.
107. Gao Y, Truonga YB, Cacioli P, Butlerb P, Kyratzisa IL. Bioremediation of pesticide contaminated water using an organophosphate degrading enzyme immobilized on nonwoven polyester textiles. *Enzyme Microbiol Technol* 2014; **54**: 38– 44.
108. Mulbry W, Ahrens E, Karns J. Use of a field-scale biofilter for the degradation of the organophosphate insecticide coumaphos in cattle dip wastes. *J Pest Sci* 1998; **52(3)**: 268-274.
109. Khalid S, Han J, Hashmi I, Hasnain G, Ahmed MA, Khan SJ, Arshad M. Strengthening calcium alginate microspheres using polysulfone and its performance evaluation: Preparation, characterization and application for enhanced biodegradation of chlorpyrifos *Sci Total Environ* 2018; **631–632**: 1046–1058.
110. Yadav M, Srivastva N, Singh RS, Upadhyay SN, Dubey SK. Biodegradation of chlorpyrifos by *Pseudomonas sp.* in a continuous packed bed bioreactor. *Bioresour Technol* 2014; **165**: 265–269.
111. Yadav M, Srivastva N, Shukla AK, et al. Efficacy of *Aspergillus sp.* for degradation of chlorpyrifos in batch and continuous aerated packed bed bioreactors. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; **175**: 16–24.
112. Jordheim LP, Durantel D, Zoulim F, Dumontet C. Advances in the development of nucleoside and nucleotide analogues for cancer and viral diseases. *Nature review* 2013; **12**: 447-464.

113. Krett NL et al. 8-amino-adenosine is a potential therapeutic agent for multiple myeloma. *Mol Cancer Ther* 2004; **3**: 1411–1420.
114. Gandhi V. et al. 8-chloro-cAMP and 8-chloroadenosine act by the same mechanism in multiple myeloma cells. *Cancer Res* 2001; **61**: 5474–5479.
115. De Clerq E, Li G. Approved Antiviral Drugs over the Past 50 Years. *Clin Microbiol Rev* 2016; **29(3)**: 695-747.
116. De Clerq E. Antivirals: Past, present and future. *Biochem Pharm* 2013; doi:10.1016/j.bcp.2012.12.011.
117. Wagner CR, Iyer VV, McIntee EJ. Pronucleotides: toward the *in vivo* delivery of antiviral and anticancer nucleotides. *Med Res Rev* 2000; **20**:417–451.
118. Iglesias LE, Lewkowicz ES, Medici R, Bianchi P, Iribarren AM. Biocatalytic approaches applied to the synthesis of nucleoside prodrugs. *Biotechnol Adv* 2015; **33(5)**: 412–434.
119. Rosowsky A, Kim SH, Ross J, Wick MM. Lipophilic 5'-(alkyl phosphate) esters of 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine and its N4-acyl and 2,2'-anhydro-3'-O-acyl derivatives as potential prodrugs. *J Med Chem*.1982; **25**: 171–178.
120. Anastasi C, Quéléver G, Burlet S, Garino C, Souard F, Kraus JL. New antiviral nucleoside prodrugs await application. *Curr Med Chem* 2003; **10**: 1825-1843.
121. Bazzanini R, Gouy MH, Peyrottes S, Gosselin G, Perigaud C, Manfredini S. Synthetic approaches to a mononucleotide prodrug of cytarabine. *Nucleosides, Nucleotides, and Nucleic Acids* 2005; **24**: 1635-1649.
122. Franchetti P, Cappellacci L, Cristalli G, Grifantini M, Pani A, La Colla P, Nocentini G. Synthesis and Evaluation of Anti-HIV-1 and Antitumor Activity of 2',3'-didehydro-2',3'-dideoxy-3-deazaadenosine, 2',3'-dideoxy-3-Deazaadenosine and Some 2',3'-dideoxy-3-deaza-adenosine 5'-dialkyl Phosphates. *Nucleosides, Nucleotides and Nucleic Acids* 1991; **10**: 1551-1562.

CAPÍTULO 2

Materiales y Métodos

2.1. REACTIVOS Y MICROORGANISMOS

Los solventes grado PA y HPLC utilizados fueron adquiridos de Anedra, Biopack, Sintorgan, o J. Baker. Los compuestos organofosforados: MP, PO, CPP y CP fueron Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA), mientras que el DDVP fue obtenido por donación de Chemotechnica SA.

Los reactivos para medios de cultivo fueron Merck o Biopack. Las bacterias estudiadas fueron obtenidas por donación de la *Colección Española de Cultivos Tipo* (CECT), Universidad de Valencia; mientras que los hongos por el Laboratorio de Micología de los Alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes.

2.2. SÍNTESIS QUÍMICA DE MPO Y CO

Se sintetizaron químicamente MPO y CO por desulfuración oxidativa de MP y CP respectivamente. A una solución 2 mM de MP o CP en 2 mL de diclorometano se le agregó gota a gota 2 mL de una solución 4 mM de ácido m-cloroperbenzoico (mCPBA), en un baño con hielo¹. La reacción fue llevada a cabo a temperatura ambiente durante 3 h con agitación magnética. El seguimiento de la reacción fue realizado por CCD en placas de sílica, utilizando como fase móvil éter de petróleo: acetato de etilo 50:50 v/v para el MPO, mientras que para el CO se empleó cloroformo: metanol 98:2 v/v.

Transcurrido el tiempo de reacción se realizaron 3 extracciones de 30 mL con una solución saturada de bicarbonato de sodio, la fase orgánica resultante se secó con sulfato de sodio anhidro y posteriormente, se evaporó el solvente por rotavap. El sólido obtenido fue purificado por cromatografía en columna empleando como fase móvil diclorometano cuando se purificó MPO y cloroformo para CO. La purificación se siguió por CCD, se confirmó la pureza e identidad de los OPs por HPLC y ¹H-RMN, respectivamente.

2.3. ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE FOSFOTRIESTERASAS BACTERIANAS

2.3.1. Cultivo bacteriano

Brevundimonas diminuta C1P71.29 (Bd); *Streptomyces phaeochromogenes* CCRC 10811 (C13) y *Streptomyces setonii* ATCC 39116 (C35); *Nocardia corynebacterioides* ATCC 14898 (C39) y *Nocardia asteroides* ATCC 19296 (C49); *Arthrobacter oxydans* ATCC 14358 (C55) y

Arthrobacter oxydans ATCC 14359 (C64) se cultivaron en sus medios óptimos de crecimiento de acuerdo con lo estipulado por CECT (Tabla 2.1.) por 72 h, a 30°C y 200rpm.

<i>Microorganismo</i>	<i>Medio de cultivo</i>
<i>Brevundimonas diminuta</i>	Medio 2 (Nutrient agar II)
<i>Streptomyces setonii</i>	Medio 118 (<i>Streptomyces</i> medium)
<i>Streptomyces phaeochromogenes</i>	Medio 118 (<i>Streptomyces</i> medium)
<i>Arthrobacter oxydans</i>	Medio 2 (Nutrient agar II)
<i>Arthrobacter oxydans</i>	Medio 2 (Nutrient agar II)
<i>Nocardias asteroides</i>	Medio 56 (YEME, Bennett's)
<i>Nocardias corynebacterioides</i>	Medio 1 con 1% maltosa (Nutrient agar I + 1% maltosa)

Tabla 2.1. Medios de cultivos (Anexo I).

2.3.2. Preparación de los biocatalizadores

2.3.2.1. Células enteras

Una vez cultivados los microorganismos tal como se mencionó en la sección 2.3.1., se determinó el crecimiento por medición de la densidad óptica a 600 nm. Considerando que $0,4 \text{ DO} = 2 \times 10^8 \text{ cél mL}^{-1}$, se determinó cantidad de cél mL^{-1} de cultivo y se tomó el volumen correspondiente para coleccionar 2×10^9 células por centrifugación (Centrifuga Beckman JA2) a 10000 rpm por 10 min a 4°C. Luego se realizó un lavado con H₂O destilada y una nueva centrifugación. El pellet resultante se empleó como biocatalizador.

2.3.2.2. Extracto enzimático

Para la obtención del extracto enzimático, y considerando que la PTE es una enzima de membrana, fue de interés obtener dicha porción de la célula de los respectivos microorganismos con actividad PTE. Para ello, se partió de las células enteras tal como lo descrito en 2.3.2.1., donde el pellet resultante se resuspendió en H₂O destilada y se llevó a cabo la disrupción celular por sonicación empleando Sonics vibra-cell modelo VCX130. Se realizaron 4 ciclos a 50% de amplitud bajo baño de hielo. El homogenato resultante fue

centrifugado a 10000 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se utilizó como biocatalizador.

2.3.3. Determinación de la actividad enzimática

2.3.3.1. Condiciones estándar

Los pellets obtenidos en el punto 2.3.2.1 fueron resuspendidos en 1 mL de una solución 2 mM de MPO en buffer Tris-HCl 50 mM pH 8 y 1% de dimetilsulfóxido (DMSO). La hidrólisis del fosfotriéster fue evaluada por triplicado, a 30°C y 200 rpm. Se tomaron muestras a 0, 15, 30, 45, 60, 90, 120 y 150 min.

Para la determinación de los parámetros cinéticos, K_m y $V_{máx}$, se llevó a cabo la reacción de hidrólisis de acuerdo a lo mencionado anteriormente, evaluándose diferentes concentraciones de sustrato: 2, 1, 0,5 y 0,1 mM.

2.3.3.2. Condiciones variables

2.3.3.2.1. Temperatura y pH

Se evaluó la actividad PTE de acuerdo con lo mencionado en el inciso 2.3.3.1., evaluando diferentes temperaturas de reacción: 30°C, 40°C, 50°C y 60°C; como así también diferentes pHs. Cuando la reacción se realizó a pH 6 y 7 se utilizó buffer fosfato de potasio 50 mM, a pH 8 y 9 buffer Tris-HCl 50 mM, finalmente con buffer Glicina-potasio 50 mM cuando se ensayó la hidrólisis a pH 10.

2.3.3.2.2. Sustrato

Diferentes OPs fueron evaluados como sustrato: MPO, PO, MP, CO, CP, CPP y DDVP. Inicialmente se preparó un stock 5X (10 mM) en el buffer correspondiente, con un % de DMSO en solución de acuerdo a lo establecido en Tabla 2.2., debido a la baja solubilidad de los OPs en agua. Por lo tanto, la mezcla de reacción posee una concentración final 2 mM de cada uno de éstos.

OPs	% DMSO
MPO	1
MP	1
PO	1
CO	4
CP	6
CPP	1
DDVP	1

Tabla 2.2. Porcentajes de DMSO en mezcla de reacción.

2.3.4. Inmovilización de célula entera y extracto enzimático; y su evaluación como biocatalizador en la hidrólisis de OPs

2.3.4.1. Inmovilización

Se inmovilizó por atrapamiento tanto las células enteras como el extracto enzimático de las bacterias previamente estudiadas, éstos fueron preparados de acuerdo a lo descrito en la sección 2.3.2. Los pellets (células enteras o extracto enzimático) fueron resuspendidos en 2,5 mL de alginato 2% p/v y se gotearon en una solución de 100 mM CaCl₂, las esferas así obtenidas se incubaron en dicha solución con agitación magnética por al menos 15-30 min. Luego se colectaron y se evaluaron como biocatalizadores para la hidrólisis de OPs.

2.3.4.2. Evaluación de los biocatalizadores inmovilizados en la degradación de OPs

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo utilizando 6 ml de una solución 0,15 mM (aproximadamente 50 mg L⁻¹) de OP en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 8 a 30°C cuando se realizó bajo condiciones estándar, y en las condiciones optimizadas expuestas en la tabla 2.3. dependiendo del microorganismo utilizado. La reacción se realizó por triplicado durante 21 días, durante los primeros 7 días se tomaron muestras cada 24 h, luego cada 72 h. Se utilizó como blanco químico, la misma mezcla de reacción sin biocatalizador.

OPs	Microorganismo	Condiciones optimizadas
MPO	C35	pH 8 - 50°C
MP	C64	pH 8 - 50°C
PO	C49	pH 8 - 50°C
CO	C49	pH 8 - 50°C
CP	C13	pH 8 - 40°C
CPP	C13	pH 8 - 40°C
DDVP	C55	pH 8 - 60°C

Tabla 2.3. Condiciones de reacción optimizadas.

2.3.4.3. Optimización de la carga enzimática del biocatalizador inmovilizado

Para la optimización de la reacción, se inmovilizaron diferentes cantidades de biocatalizador tanto células enteras como extracto enzimático, incorporando a la mezcla de reacción 2, 4, 6 y 10 veces más biocatalizador respecto de la cantidad propuesta para la condición estándar $1X=2 \times 10^9$ cél mL⁻¹. Luego su actividad PTE fue evaluada bajo la metodología descrita en 2.3.4.2.

2.3.5. Diseño de reactor para el tratamiento de aguas contaminadas con OPs

Con el objetivo de armar un reactor de lecho empacado, se utilizó un reactor tubular cilíndrico de vidrio de un volumen total de 150 ml. Este reactor posee una invaginación lateral, la cual permite la inserción de un sensor de temperatura en el seno del líquido a fin estimar la temperatura a la cual trabaja minuto a minuto. La regulación de la temperatura se realizó por un sistema diseñado previamente en nuestro laboratorio. Éste posee cintas calefactoras flexibles de silicona, la que fue fácilmente enrollada sobre el reactor tubular; y conectada a un sistema de calefacción controlada por un pirómetro (Novus N321). La temperatura de trabajo fue *seteada* y censada por una termocupla, controlándose así la temperatura del sistema. Adicionalmente el pirómetro permitió hacer ajustes de calentamiento-enfriamiento, y de esta manera iniciando la calefacción antes de que la temperatura esté por debajo de la temperatura de trabajo, y que el mismo finalice antes de que la temperatura esté por sobre el *set point* en el que ha sido ajustado. Por su parte, el flujo

fue regulado mediante el uso de una bomba peristáltica con cabezal de dos vías, y se emplearon mangueras de silicona curada al platino con diámetro de 3 mm.

En base a los resultados obtenidos de la optimización del biocatalizador inmovilizado, la mezcla de reacción posee perlas de alginato en las cuales se inmovilizaron de 2×10^9 cél mL⁻¹ (1X). Cuando se ensayó la degradación de PO, el microorganismo inmovilizado fue C49, mientras que para el tratamiento de CPP, se inmovilizó Pd. El volumen muerto del reactor fue determinado: 38 mL, mientras que el reservorio poseía un volumen de 150 mL con 0,15 mM de PO o CPP. Una vez iniciado el ciclo de degradación del OP se tomaron muestras a distintos tiempos, fueron analizados y cuantificados por diferentes metodologías de acuerdo con el OP ensayado (Sección 2.6., Capítulo 2).

2.3.5.1. Caracterización del reactor

2.3.5.1.1. Determinación del tiempo de residencia y tipo de flujo

La determinación del tiempo de residencia del reactor tubular se llevó a cabo mediante un ensayo “estímulo-respuesta”, para ello inicialmente se hizo recircular por el reactor una solución de biftalato de potasio 0,1 mM pH 4 a un flujo de 0,5 mL min⁻¹. Una vez estabilizado el pH se realizó un pulso del trazador tetraborato de sodio 0,1 mM pH 8,9. A la salida del reactor se fueron colectando muestras de 1 mL y determinándoles el pH a cada una de ellas.

Con los datos colectados del cambio del pH en el tiempo, se determinó el tiempo de residencia medio y la dispersión del reactor empleando las ecuaciones de la siguiente tabla:

Paso	Ecuaciones	Observaciones
1	$pH(t)$	Inyección del trazador en un instante $t = 0$ y medición del pH (t) en el efluente en función del tiempo.
2	$Der(i) = \frac{pH(i+1) - pH(i)}{\Delta t}$	Construcción de la curva pH(t). A partir de ella se calculó la derivada en cada punto, obteniéndose la curva E(t) (Der(i) vs t(i)), donde el valor máximo representa el tiempo de retención.

3	$tR = \frac{\sum_i Der(i)t(i)\Delta t}{\sum_i Der(i)\Delta t}$	El tiempo de retención medio tR es el primer momento de la distribución dada por la gráfica E(t)
4	$\sigma^2 = \frac{\sum_i Der(i)t(i)^2\Delta t}{\sum_i Der(i)\Delta t} - tR^2$	Determinación de la varianza (σ^2) de la curva Der (i) vs t(i), osea el cálculo del área bajo la curva de la gráfica; permite dar una idea del grado de dispersión, determinándose el segundo momento de distribución.
5	$\frac{\sigma^2}{tR^2} = \frac{2}{Pe + 1} \text{ válida para } \frac{\sigma^2}{tR^2} \leq 0,3$ $Pe = \frac{vL}{D_z}$	Cálculo de la dispersión utilizando el método de la varianza, que relaciona σ^2 con Pe donde: v = velocidad del fluido dentro del tubo, L=Longitud del reactor y D_z =coeficiente dispersión axial.

Tabla 2.4. Ecuaciones para la determinación de los tiempos de residencia media, Peclet y tipo de flujo.

2.3.5.1.2. Reutilización y productividad

Los reusos del sistema se evaluaron llevando acabo tantos ciclos de degradación como el reactor mantuviese el 50% de la actividad respecto del primer ciclo. Cada uno de estos ciclos fueron llevados a cabo al igual que lo mencionado en la sección 2.3.5. Entre cada ciclo se realizaron lavados con 2 volúmenes de columna empleando buffer Tris-HCl pH8.

2.4. ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE FOSFOTRIESTERASAS FÚNGICAS

Tras el análisis de bibliografía^{2, 3} y considerando las cepas disponibles dentro del cepario del Laboratorio de Micología de los alimentos de la UNQ, se seleccionaron tres géneros fúngicos a evaluar: *Aspergillus*, *Fusarium* y *Penicillium*.

2.4.1. Cultivo de hongos

Se creció *Aspergillus niger* (ASN), *Fusarium sp* (FSP), *Penicillium chrysogenum* (PENCH) y *Penicillium nalgiovence* (PENNL) en medio sólido de acuerdo a sus medios óptimos de crecimiento (Tabla 2.5.) durante 7 días a 26°C. Con el fin de conservar dichas cepas a partir de los microorganismos crecidos en medio sólido, se repicaron en cultivos líquidos de ágar-agua 20%. Una vez crecidos, se alicuotaron en criotubos conteniendo 15% de glicerol para conservarse en freezer a -80°C.

Por su parte, para obtener el biocatalizador se inoculó en 150 mL de los medios correspondientes para cada hongo con 1×10^5 esporas mL^{-1} y se incubó a 30°C y 130 rpm durante 10 días. Para llevar a cabo el conteo de esporas del inóculo inicial, se tomaron esporas del cultivo en medio sólido y fueron suspendidas en 2 mL de H_2O_d estéril. Posteriormente se tomaron 20 μL de dicha suspensión y fueron depositadas en cámara de Neubauer. Bajo microscopio óptico, se realizó conteo de acuerdo a lo reportado por French & Heber⁴. Finalmente la determinación de esporas mL^{-1} fueron calculadas de acuerdo a la Ecuación 2.1.

<i>Microorganismo</i>	<i>Medio de cultivo</i>
<i>A. niger</i>	CYA (Czapek yeast extract)
<i>Fusarium sp</i>	MEA (Malt extract)
<i>P. chrysogenum</i>	MEA
<i>P. nalgiovence</i>	MEA

Tabla 2.5. Medios de cultivos fúngicos. (Anexo II)

$$\text{Esporas. mL}^{-1} = \frac{(C1 + C2 + C3 + C4 + C5)}{5} 25.10^4$$

Ecuación 2.1. Determinación de concentración de esporas por conteo en cámara de Neubauer, siendo C1,C2,C3,C4 y C5 número de esporas en los respectivos cuadrantes.

2.4.2. Determinación de la actividad hidrolítica fúngica

La actividad hidrolítica de los hongos propuestos fue determinada utilizando MPO como sustrato. Se evaluó la hidrólisis en *growing*, como así también del sobrenadante resultante del cultivo fúngico a fin de comprobar actividad PTE extracelular.

La reacción en growing fue llevada a cabo a partir de 10 mL de cultivo fúngico. Por su parte, para la obtención del medio extracelular, la misma cantidad de cultivo fúngico fue centrifugado a 14000 rpm durante 15 min. El sobrenadante obtenido, fue filtrado a presión reducida con un filtro de 0,22 μ m, el filtrado resultante se empleó como fuente de biocatalizador. Finalmente, se agregó 2mM de MPO y se tomaron muestras durante 21 días.

Habiendo determinado que los microorganismos poseen actividad PTE extracelular, se evaluó la hidrólisis a pH 8, considerando que en su mayoría estas enzimas suelen ser más activas a dicho pH. El pH del medio extracelular de los hongos evaluados se encuentra en el rango de pHs ácidos entre 2 y 5. Por consiguiente, fueron llevados a pH 8 con una solución de KOH 1M. Posteriormente se le agregó la masa necesaria de MPO para una concentración final 2 mM, finalmente se tomaron muestras durante 21 días.

2.4.3. Aislamiento de PTE fúngica extracelular

- *Metodología I:* Para el aislamiento de las proteínas extracelulares, al cultivo fúngico obtenido en 2.4.2. se le agregó 80% de sulfato de amonio y se incubó *overnight (ON)* a 4°C con el fin de llevar a cabo la precipitación de las proteínas. El precipitado fue colectado por centrifugación a 7500 rpm, y resuspendido en la mínima cantidad de buffer Tris HCl pH 8 50mM. Posteriormente a fin de eliminar las sales de la precipitación se llevó a cabo una diálisis, incorporando dentro de la membrana la solución proteica, posteriormente se sumergió en un vaso de precipitados conteniendo 1 L de buffer Tris HCl pH 8, 50 mM, y se lo incubó ON.

- *Metodología II:* A partir de lo obtenido en 2.4.2. se procedió directamente a concentrar y separar proteínas por tamaño por ultra centrifugación empleando un centricon Vivaspin 20, Sartorius® que posee una membrana con un *cut off* de 10 kDa. Una vez obtenido el crudo enzimático, una fracción de éste se conservó y otra fue liofilizada. A ambas fracciones se le determinó la concentración proteica por el método de Bradford.

2.4.3.1. Determinación de proteínas totales del extracto enzimático fúngico

Se determinó cantidad de proteínas totales presentes en el extracto mediante ensayo de Bradford, empleando Albúmina sérica bovina (BSA) como patrón de la calibración. En placas de 96 pocillos se incorporaron 200 μ L del reactivo de Bradford y 10 μ L de muestra proteica

por pocillo, luego se incubó por 5 minutos. Posteriormente se midió absorbancia a 595 nm, empleando como lector de placas, Cytation 5.

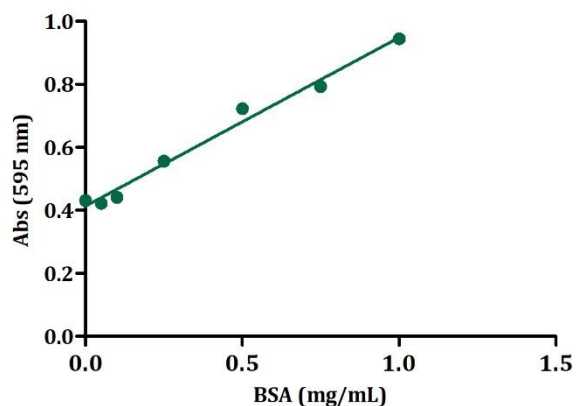


Gráfico 2.1. Curva de calibración de BSA.

Slope	529980000 ± 857800
X=0.0	90800 ± 48080
Y=0.0	-0.003029
R²	0,9871
Ecuación de CC	y= 529980000x + 90800

Tabla 2.6. Ecuación de CC por análisis de regresión lineal.

2.4.4. Determinación de la actividad hidrolítica del extracto enzimático

Considerando que los extractos enzimáticos descriptos en 2.4.4 fueron concentrados 40 y 50 veces, se tomaron 20 µL de los mismos y fueron resuspendidos en 1mL de una solución 2 mM de MPO en MEA y 1% de DMSO. La hidrólisis del fosfotriéster fue llevada a cabo por triplicado, a 30°C y 200 rpm. Se tomaron muestras por 21 días, las que fueron analizadas y cuantificadas de acuerdo a la sección 2.6. (Cap 2).

2.5. AISLAMIENTO DE NUEVAS FUENTES FOSFOTRIESTERÁSICAS DE SUELO

Previamente en nuestro laboratorio se habían aislado a partir de muestras de suelo dos bacterias con actividad fosfotriesterásica. En este trabajo se llevó a cabo la identificación de las mismas en colaboración con la Dra. Lorena Rojas y el Dr. Daniel Ghiringhelli, del Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular, Área Virosis de Insectos (LIGBCM-AVI). Posteriormente, se estudió la actividad hidrolítica frente a diferentes OPs.

2.5.1. Identificación de especies bacterianas a nivel de género de dos cultivos bacterianos mediante análisis del 16S rDNA

2.5.1.1. Extracción de ADN total

Se realizaron cultivos en placa de Petri con medio Luria Bertani (LB) mediante estrías por agotamiento. De cada placa se tomó material proveniente de 1 colonia, se colocó en un tubo tipo eppendorf de 0,5 ml y se resuspendió en 30 µl de agua bidestilada estéril. Se procedió a la lisis mediante incubación a 100 °C en baño maría durante 5 min. Finalmente, se centrifugó a 16000 g durante 3 min y se recuperó el sobrenadante.

2.5.1.2. Amplificación

Se utilizaron 2 µl de cada muestra obtenida en 2.5.1.1 como molde para las reacciones de amplificación del 16S rDNA mediante PCR utilizando primers diseñados específicamente para esta amplificación (24F⁵ y 1492R⁶) en 20 µl finales.

La amplificación se realizó en un ciclador térmico Verity Thermal Cycler (Applied Biosystems, USA) con Taq Pegasus ADN polimerasa (PB-L SA, Argentina). La concentración final utilizada de MgCl₂ fue 3 mM y de dNTPs 0,5 mM. Se emplearon concentraciones estándar de buffer y primers. El perfil de amplificación fue: 95 °C 180 segundos (s), 35 x [72 °C 120 s], 72°C 420 s.

2.5.1.3. Electroforesis en gel de agarosa

Las electroforesis de ADN en geles de agarosa se realizaron en sistema sumergido y la concentración de agarosa utilizada fue de 0,8 % m/v debido al tamaño de los fragmentos analizados. Los geles fueron preparados en buffer TAE (40 mM Tris-Ac pH=8, 1 mM EDTA) conteniendo 0,5 µg mL⁻¹ de bromuro de etidio. Las corridas electroforéticas se realizaron con el mismo buffer, a un voltaje constante entre 4 y 7 V cm⁻¹. Las muestras de ADN se sembraron utilizando buffer de siembra (TAE 1X, glicerol 50%, Orange G) en una proporción 2:1. Se sembraron alícuotas del 10 % de cada reacción y se empleó como referencia el ladder 1 kb (PB-L SA, Argentina). Los tamaños de los fragmentos se estimaron utilizando marcadores de tamaño comerciales como patrones de referencia (Ladder50 pb, Ladder 100 pb, Ladder 400 pb, Ladder 1kpb plus, λ/HindIII y λ/BstEI de PB-L SA, Argentina).

Para la visualización del ADN se utilizó un transiluminador de luz UV DyNA Light Dual Intensity UV Transilluminator (Labnet). Las imágenes de cada electroforesis se digitalizaron

mediante el programa Kodak Digital Science 1D, empleando la cámara Kodak Electrophoresis Documentation and Analysis system 120.

2.5.1.4. Purificación de productos y secuenciación

Los productos de reacción obtenidos de PCR se purificaron mediante un kit de purificación en columna (Monarch PCR & DNA Cleanup Kit, New England Biolabs, EEUU), siguiendo las indicaciones del fabricante. La secuenciación de los productos de PCR purificados, se realizó por el servicio de secuenciación automática de MACROGEN (Macrogen Inc., Gasan-dong, Seoul, República de Corea).

2.5.1.5. Análisis bioinformático

Los análisis bioinformáticos se realizaron con las herramientas Ribosomal Database Project (RDP) y Silva database, y el alineamiento múltiple de las secuencias se realizó mediante el algoritmo de Needleman-Wunsch empleando el programa ClustalX. Los árboles filogenéticos se construyeron mediante Neighbor-Joining y fueron obtenidos a partir de la base de datos Silva.

2.5.2. Determinación de la actividad fosfotriesterásica y puesta a punto de las condiciones de reacción de los microorganismos aislados.

La actividad hidrolítica de los microorganismos aislados, así como la puesta a punto de las condiciones de reacción se llevaron a cabo en Cytation 5. Este equipo, permitió efectuar las cinéticas enzimáticas analizando en tiempo real la formación de los productos de hidrólisis.

Cuando se estudió la actividad fosfotriesterásica en condiciones estándar y su optimización de pH y temperatura con MPO, como así también la aceptación de sustrato (MP, PO, CO y CP) las mezclas de reacción fueron preparadas al igual que en la sección 2.3.3. Estas se depositaron en placas de 24 pocillos, e incubadas a la temperatura (según corresponda) y agitación de trabajo en Cytation 5 por 2,5 h. Período en el que transcurrió la reacción y, al mismo tiempo se determinó la formación de PNF o CF, de acuerdo al sustrato estudiado, por medición de absorbancia o fluorescencia respectivamente. Adicionalmente se incorporaron blancos de reacción: a) Mezcla reacción sin enzima y b) Mezcla de reacción sin sustrato.

Finalmente cuando se estudió la hidrólisis de DDVP y CPP, la reacción fue llevada a cabo como en la sección 2.3.3 no solo en cuanto a la composición de la mezcla de reacción sino también en cuanto a la metodología.

2.6. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA

El análisis de las muestras para la cuantificación de la velocidad de reacción se diseñó en base al sustrato o el producto de hidrólisis, lo que dependió del sustrato empleado.

2.6.1. MPO, PO y MP

MPO, PO y MP, tras ser utilizados como sustratos en las reacciones biocatalizadas de hidrólisis dan como producto *p*-nitrofenol (PNF). Es por esto que las muestras obtenidas a partir de dichas experiencias fueron analizadas bajo la misma metodología.

Considerando que el PNF tiene su máximo de absorción a 405-410 nm, se analizaron las muestras en lectora de placa Cytation 5 a 405nm. La cuantificación se realizó empleando una curva de calibración (CC) de PNF a las siguientes concentraciones: 0; 0,01; 0,025; 0,05; 0,075; 0,1 mM. En el gráfico 2.1. se muestra a modo de ejemplo una CC, como así también su análisis por regresión lineal en Prisma Graph pad (Tabla 2.8.).

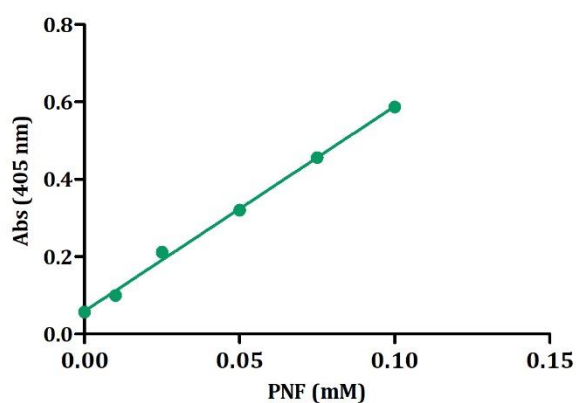


Gráfico 2.2. Curva de calibración de PNF.

Pendiente	5.298 ± 0.108
X=0.0	0.05901 ± 0.0061
Y=0.0	-0,01114
R²	0,9934
Ecuación de CC	y= 5.298x + 0.059

Tabla 2.7. Ecuación de CC por análisis de regresión lineal

2.6.2. CO y CP

Por su parte CO y CP dan como producto de hidrólisis clorferón (CF), es por ello que las muestras obtenidas de las reacciones llevadas a cabo con dichos sustratos fueron analizadas

cuantificando la formación de este. Inicialmente se diseñó un método para su análisis por HPLC en el cual se utilizó como fase móvil CH₃CN:H₂O 55:45 (v/v), un tiempo total de 8 min y flujo 0,9 mL min⁻¹. El CF fue detectado por absorbancia a una longitud de onda de 360 nm y presentó un tiempo de retención (t_R) de 3 min. Una segunda metodología fue propuesta en la cual se llevó a cabo la medición de fluorescencia, considerando que para el CF el λ_{em}= 355nm y el λ_{ex}=460 nm, en lectora de placas Cytation 5. En ambos casos, se realizó una curva de calibración a partir del CF; posteriormente, basándose en ésta se cuantificó el producto de reacción de las muestras.

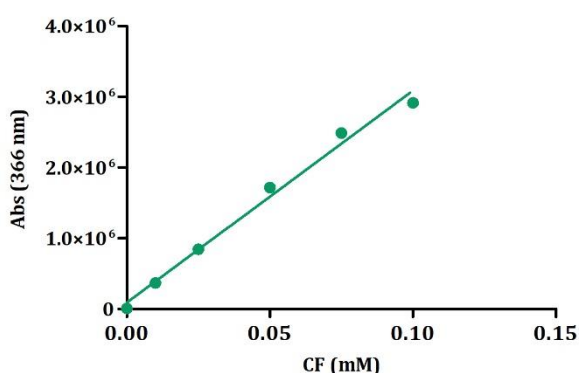


Gráfico 2.3. Curva de calibración de CF.

Pendiente	529980000 ± 857800
X=0.0	90800 ± 48080
Y=0.0	-0.003029
R²	0,9871
Ecuación de CC	y= 529980000x + 90800

Tabla 2.8. Ecuación de CC por análisis de regresión lineal.

2.6.3. CPP

El consumo de CPP fue detectada por HPLC a 235 nm, empleando columna C18 Fortis: 5µm, 150x 4,6mm. La fase móvil utilizada fue agua con 1% ácido fosfórico: acetonitrilo 80:20 v/v durante 10 min con un flujo de 0,9 ml min⁻¹.

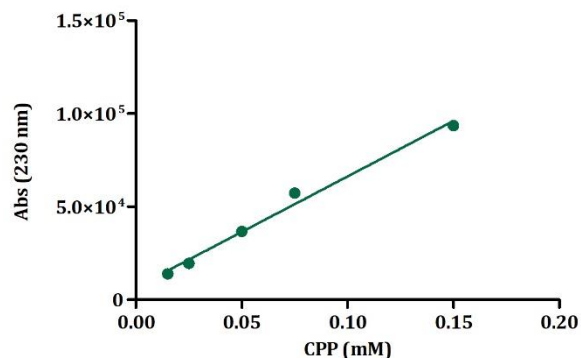


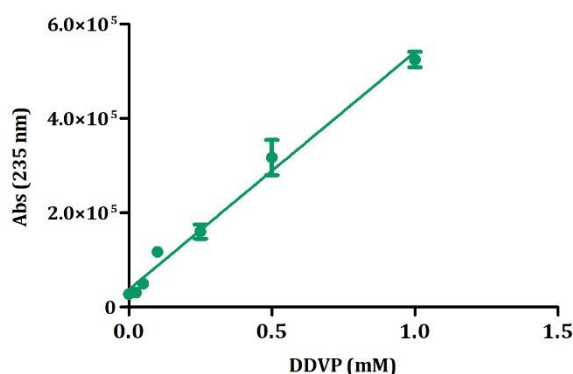
Gráfico 2.4. Curva de calibración de CPP.

Tabla 2.9. Ecuación de CC por análisis de regresión lineal.

Pendiente	596300 ± 37400
X=0.0	6648 ± 2968
Y=0.0	-0,01115
R²	0,9883
Ecuación de	y= 596300x + 37400

2.6.4. DDVP

La actividad enzimática empleando DDVP como sustrato, se analizó por consumo del mismo, ya que sus productos de hidrólisis no absorben al UV. El DDVP tiene un máximo de absorción a 280 nm, con lo cual se analizó por HPLC, utilizando un método isocrático de 16 min, 48:52 ACN: H₂O, flujo 0,9 ml min⁻¹. Columna C18 Fortis: 5µm, 150x 4,6mm.

**Gráfico 2.5.** Curva de calibración de DDVP.

Pendiente	503400 ± 21830
X=0.0	36910 ± 9502
Y=0.0	-0,07332
R²	0,9779
Ecuación de	y= 503400x + 36910
CC	

Tabla 2.10. Ecuación de CC por análisis de regresión lineal

2.6.5. Análisis estadístico

Se realizaron análisis estadísticos de los resultados obtenidos en *Graph Pad Prisma* determinando:

- Regresión lineal, para la determinación de las pendientes de las curvas de las cinéticas enzimáticas (concentración de sustrato o producto en función del tiempo), las que se corresponden con las velocidades iniciales de reacción (V_0). Adicionalmente fue empleado para determinar las ecuaciones de las curvas de calibración.
- ANOVA de 1 vía seguido de post-test Tukey o Dunnet, cuando se compararon los resultados obtenidos contra un control.
- ANOVA de 2 vías seguido post-test Bonferroni fue utilizado cuando se realizaron comparaciones múltiples como por ejemplo, en el caso de las comparaciones bajo diferentes condiciones de reacción (STD y OPT) respecto de los diferentes biocatalizadores.
- Regresión no lineal, Cinética enzimática, Michaelis Menten, para la determinación de los parámetros K_m y $V_{m\acute{a}x}$.

En todos los casos se indicó la interacción en las comparaciones como: *** $P < 0,001$;

** $P < 0,01$; * $P < 0,05$.

2.7. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE DIMETIL FOSFATO DE INOSINA

2.7.1. Preparación del biocatalizador

La obtención del biocatalizador empleado para la síntesis enzimática de dimetil fosfato de inosina se llevó a cabo de acuerdo a lo detallado en 2.3.2. El extracto enzimático resultante fue liofilizado y conservado a -20°C hasta su uso. La cantidad de proteínas totales se determinaron por el método de Bradford (Sección 2.4.3.1, Cap 2).

2.7.2. Reacción de transesterificación enzimática

10 mM de MPO en presencia de 100 mM de inosina, 20 mg del extracto enzimático y 150 mg de tamices moleculares en 1 mL de DMF anhidro fueron incubados a 40°C y 200 rpm. Se tomaron muestras cada 24 horas durante 4 días y se las analizó por HPLC y ³¹P-RMN. Adicionalmente se llevó a cabo como control una mezcla de reacción con inosina en ausencia de enzima, como así también la mezcla de reacción empleando como nucleófilo agua en lugar de MPO.

2.7.3. Análisis de muestras y cuantificación del producto de interés

Las muestras obtenidas a partir de la transesterificación enzimática fueron analizadas por absorbancia a 254 nm en HPLC Beckman con inyección manual o Gilson con inyección automática, empleando una columna C18, Grace. Se realizó una corrida en gradiente donde la fase móvil fue Acetonitrilo:Agua (Tabla 2.11.) a un flujo 0,9 mL/min.

Tiempo (min)	Proporción ACN:H₂O
0	65:45
15	95:5
18	95:5
30	65:45

Tabla 2.11. Metodología desarrollada para análisis de muestras de mezcla de reacción de síntesis de DMPIno.

BIBLIOGRAFÍA

1. Bielawski J, Casida JE. Phosphorylating intermediates in the peracid oxidation of phosphorothionates, phosphorothiolates, and phosphorodithioates. *J Agr Food Chem* 1988; **36**: 610–5.
2. Alvarenga N, Birolli WG, Seleglim MHR, Porto ALM. Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense* *Chemosphere* 2014; **117**: 47-62.
3. Jain R, Garg V. Enzymatic Degradation of Monocrotophos by Extracellular Fungal OP Hydrolases *Appl Biochem Biotechnol* 2013; 171: 1473-1486.
4. French E. and T. Hebert: Métodos de Investigación de fitopatología. Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, Costa Rica, p. 289, 1988.
5. Ludwig W, Mittenhuber G, Friedrich CG. Transfer of *Thiosphaera pantotropha* to *Paracoccus denitrificans*. *Int J Syst Bacteriol* 1993; **43**:363–367.
6. Oguntinyinbo FA. Monitoring of marine *Bacillus* diversity among the bacteria community of sea water. *Afr J Biotechnol* 2007; **6**:163–166.

CAPÍTULO 3

“Estudio y optimización de las condiciones de reacción de nuevas fuentes bacterianas con actividad fosfotriesterasa”

OBJETIVOS

- **Objetivo General**

Estudiar las fuentes bacterianas con actividad fosfotriesterasa previamente seleccionadas a partir de un cepario *wild type*.

- **Objetivos específicos**

1. Cuantificación de la actividad hidrolítica de seis nuevas bacterias seleccionadas como fuentes de fosfotriesterasas, empleando MPO como sustrato modelo.
2. Optimización de las condiciones de reacción de la hidrólisis de MPO.
3. Aplicación de los biocatalizadores en la degradación de diferentes OPs.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. SÍNTESIS QUÍMICA DE METIL PARAOXÓN Y COROXÓN

Los análogos oxigenados del CP y MP fueron sintetizados por desulfuración oxidativa, empleando como agente oxidante mCPBA. Tras la purificación por extracción, seguido de cromatografía en columna se obtuvo un rendimiento del 66% de MPO, verificando la hidrólisis del MP o MPO tras observarse la formación de PNF (26,2%). Por su parte la obtención de CO arrojó un rendimiento del 40%.

El análisis del MPO por HPLC tras su purificación mostró una sola señal con un $t_R=19,5$ min, mientras que para el CO una señal con $t_R=3$ min. El espectro de ^1H -RMN para MPO arrojó los siguientes resultados: δ 8,26 (2H, d, fenilo, $J=8,9$ Hz), 7,42 (2H, d, fenilo, $J=8,9$ Hz), 3,86 (6H, d, CH_3O , $J=11,5$ Hz). Mientras que con el espectro de coroxón se obtuvo: δ 7,59 (1H, d, $J=7,5$ Hz), 7,19 (1H, d, $J=1,3$ Hz), 7,07 (1H, dd, $J=7,5, 1,3$ Hz), 4,13 (4H, dq, $J=8,6, 6,0$ Hz), 2,55 (3H,s), 1,20 (6H,t, $J=6,0$ Hz).

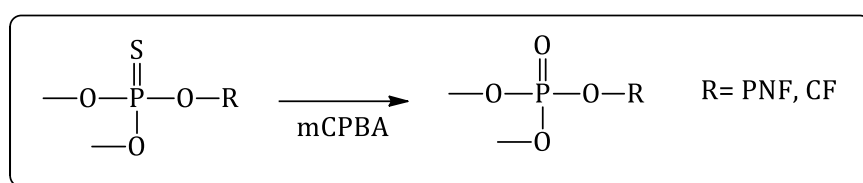


Figura 3.1. Síntesis química de CO y MPO.

3.2. HIDRÓLISIS DE COMPUESTOS ORGANOFOSFORADOS POR FOSFOTRIESTERASAS BACTERIANAS

3.2.1. Reacción de hidrólisis en condiciones estándar

Seis cepas bacterianas resultaron positivas de un cribado de actividad fosfotriesterasa en medio sólido, realizado previamente en nuestro laboratorio: *Streptomyces phaeochromogenes* CCRC 10811 (C13), *Streptomyces setonii* ATCC 39116 (C35), *Nocardia corynebacterioides* ATCC 14898 (C39), *Nocardia asteroides* ATCC 19296 (C49), *Arthrobacter oxydans* ATCC 14358 (C55) y *Arthrobacter oxydans* ATCC 14359 (C64).

En el presente trabajo, se emplearon dichos microorganismos como biocatalizadores en la degradación de OPs. Inicialmente se cuantificó la actividad hidrolítica bajo condiciones estándar (STD: 30°C – pH8) determinando la velocidad inicial (V_0) de hidrólisis frente a un OP modelo, el MPO, considerando que no posee grupos voluminosos que impidan su ingreso al sitio activo de la enzima. Adicionalmente, el hecho de poseer enlace $\text{P}=\text{O}$

respecto de los OPs tioésteres ($P=S$), le confiere mayor solubilidad y reactividad. Finalmente, es importante destacar que el producto de hidrólisis de este compuesto, el PNF, puede ser cuantificado fácilmente por absorbancia. Se empleó como control positivo uno de los microorganismos estudiados en mayor profundidad en la actividad de interés, *Brevundimonas diminuta* (Bd).

Con el fin de evaluar la actividad fosfotriesterasa de los diferentes biocatalizadores frente al MPO, se estudió la formación de PNF a lo largo del tiempo. A partir de los resultados obtenidos en la cuantificación del producto de hidrólisis, se realizó un análisis de regresión lineal en *GraphPad Prism*, y se determinó las pendientes de las mismas (Gráfico 3.1.), las que se corresponden con el valor de V_0 de reacción empleando 2 mM de MPO (Gráfico 3.2.). Al analizar dichos resultados comparándolos estadísticamente, se observó que las cepas C49 y C13 exhibieron tres veces más actividad PTE que Bd, mientras que C35, el doble. Los otros microorganismos fueron menos activos que el control positivo. Estudios previos describieron bacterias de diferentes géneros en la degradación de OPs, entre ellas: *Flavobacterium*, *Bacillus*, *Agrobacterium*, *Arthrobacter* y *Nocardia*¹; mientras que las estudiadas en el presente trabajo son de diferentes especies respecto de las mencionadas en bibliografía.

Adicionalmente, se realizó una aproximación de los parámetros cinéticos michaelianos, K_m y V_{max} , a partir de las V_0 determinadas empleando diferentes concentraciones de sustrato. De acuerdo con lo planteado por Michaelis-Menten, K_m , indica la concentración del sustrato cuando la velocidad de reacción es igual a la mitad de la velocidad máxima de la reacción. Dicha constante se puede considerar como una medida de la unión de un sustrato con una enzima determinada, conocida también como su afinidad de unión. Un bajo valor de K_m indica una gran afinidad de unión, ya que la reacción se aproximará a V_{max} más rápidamente. Por el contrario, un alto K_m indica que la enzima no se une tan eficientemente con el sustrato, y V_{max} solo se alcanzará si la concentración del sustrato es lo suficientemente alta como para saturar la enzima. En este sentido, es interesante mencionar que dichos parámetros cinéticos pueden variar dependiendo del sustrato, solventes, temperatura y pH en el que se lleve a cabo la reacción. Estudios previamente reportados sobre la PTE de Bd, expusieron un valor para K_m de 0,05 mM cuando la reacción de hidrólisis se llevó a cabo con PO como sustrato. Adicionalmente cuando los grupos etilos fueron sustituidos por metilos (MPO), K_m incrementó su valor dos órdenes de magnitud pero la $V_{máx}$ no varió significativamente^{2, 3}. Esto permite explicar el incremento del valor de la K_m arrojada para la Bd estudiada en este trabajo (Tabla 3.1.), respecto de lo reportado previamente.

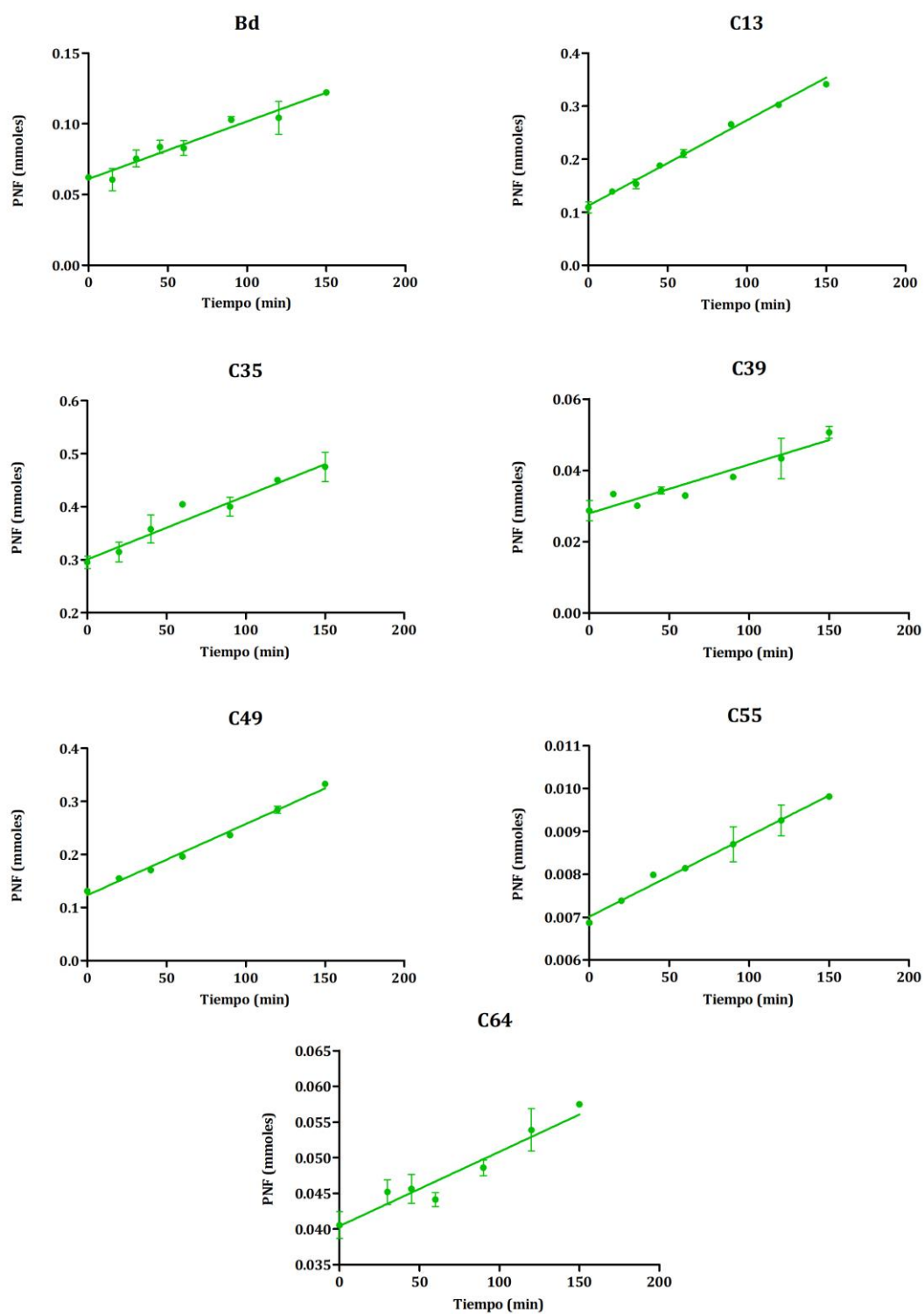


Gráfico 3.1. Concentración de PNF (mmoles) vs Tiempo (min).

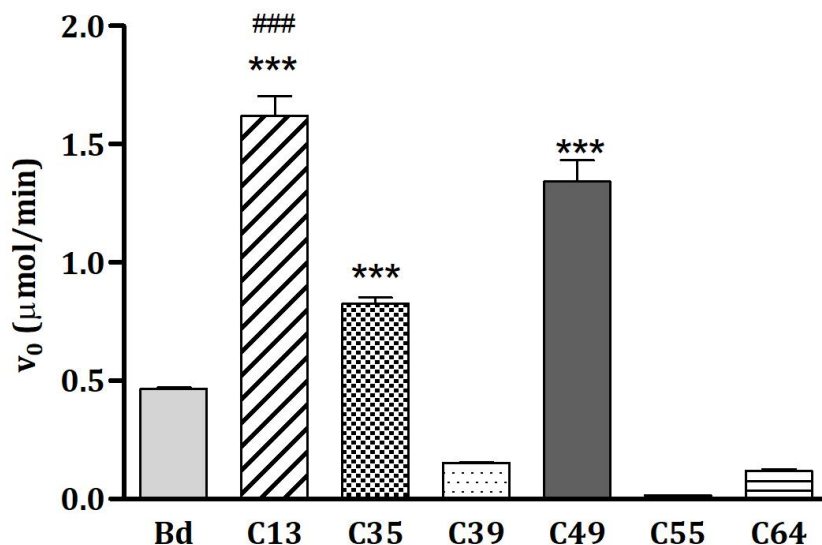


Gráfico 3.2. Velocidades iniciales de hidrólisis de los difentes microorganismos ensayados como biotacalizadores en la degradación de MPO en condiciones estándar.

	Km (mM)	Vmax (mM/min)
Bd	2,52 ± 0,22	1,01 ± 0,04
C13	1,14 ± 0,14	2,51 ± 0,14
C35	0,97 ± 0,05	0,56 ± 0,04
C39	0,39 ± 0,02	0,17 ± 0,02
C49	1,72 ± 0,09	2,68 ± 0,81
C55	ND	ND
C64	1,70 ± 0,60	0,19 ± 0,04

Tabla 3.1. Parámetros cinéticos de biocatalizadores en la hidrólisis de MPO a pH8, 30°C.

3.2.2. Estudio de la actividad fosfotriesterásica en condiciones de reacción variables

3.2.2.1. Temperatura y pH

La degradación de OPs por microorganismos en ambientes contaminados, depende de numerosos factores como el tipo de pesticida, la frecuencia de su uso y los ciclos de aplicación, como así también del pH, contenido nutricional, la diversidad microbiana, la temperatura y el potencial redox^{4,5,6}.

El pH y la temperatura son unas de las principales variables que afectan directamente a la actividad enzimática. Estudios realizados demostraron que el incremento en el pH del suelo estimula a una mayor población y diversidad microbiana, resultando en un incremento en las actividades enzimáticas. Asimismo, también se observó que enzimas involucradas en el ciclo del C, N, S y P fueron sensibles a dicha variación⁷. En cuanto a la degradación de OPs, se ha reportado dicha influencia en la hidrólisis en suelo del clorpirifós y del fenamifós; donde se demostró que al aumentar el pH también lo hacía la degradación de dichos OPs^{8, 9,10}. Por su parte, también se estudió la relación de la temperatura con la degradación de los dos OPs anteriormente mencionados en suelo. Se observó a 35°C el máximo de actividad, como así también que conforme disminuía la temperatura (hasta 5°C), la actividad también lo hacía¹¹. En este sentido, y considerando la importancia de estos factores, se evaluaron los perfiles de actividad frente a diferentes pHs y temperaturas de los biocatalizadores hallados previamente.

En principio se evaluó la hidrólisis de MPO, sustrato modelo, en un rango de pHs entre 6 y 10, manteniendo el resto de las variables constantes. En el Gráfico 3.4. se observa que *Bd* posee mayor actividad hacia pHs básicos, con un máximo a pH 8. Las cepas C13, C35 y C49 mostraron mayor actividad hidrolítica a pH 10, 7 y 8, con un aumento de 7, 6 y 3 veces en relación a la cepa control, respectivamente. Cuando se comparan las actividades respecto al pH estándar (pH 8), C13 exhibió un aumento de aproximadamente el doble en su actividad a pH 10, C35 y C39 la triplicaron a pH 7 y pH 9 respectivamente.

Es importante destacar a C35, que a pesar de poseer su máximo de actividad a pH 7, también exhibe altos valores de hidrólisis a pH 6. Estos resultados son de interés en aplicaciones particulares como las que han sido propuestas para *Lactobacillus brevis*, el cual fue ensayado en la descontaminación de alimentos ácidos¹².

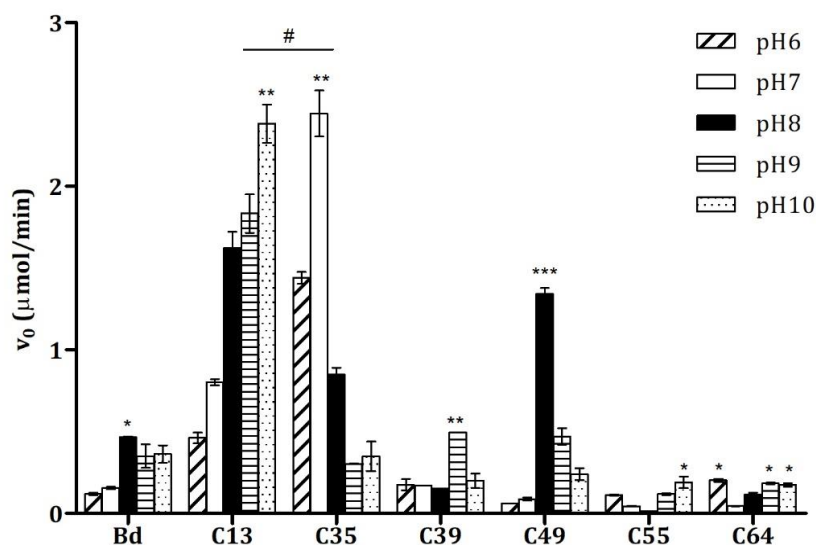


Gráfico 3.3. Variación de la actividad PTE frente al pH.

Como bien se ha mencionado, la temperatura es otro de los parámetros que influyen en la actividad enzimática. En general, las fosfotriesterasas más estudiadas y caracterizadas como las de *Bd* y *Agrobacterium radiobacter* son mesófilas¹³. Dentro de dicho grupo, entre los microorganismos estudiados en este trabajo, se destaca C13, que tiene su máximo de actividad a 40°C. Si bien el resto de los microorganismos poseen mayor actividad a otras temperaturas, son activos en el rango mesófilico. Por su parte las cepas 35, 49 y 64 exhiben su máximo de actividad a 50°C, mientras que C39 fue más activa a 60°C. Estos resultados son notables, debido a la necesidad de nuevas enzimas termoestables en biorremediación para la degradación de OPs en climas extremos. Han sido reportadas pocas PTE hipertermófilas, dentro de ellas la de *Sulfolobus solfataricus* MT4, es una arquea que ha sido estudiada dentro de un intervalo de 30-95°C, observándose un aumento de actividad con la temperatura¹⁴. Tras la determinación de las V_0 de reacción a diferentes temperaturas (Gráfico 3.4.), se determinó que C13 fue 2 veces más activa a 40°C que en condiciones estándar, y 8 veces más que Bd en las mismas condiciones. C49 y C35 mostraron a 50°C siete y treinta veces más actividad PTE que a 30°C respectivamente; cuando se las comparó con Bd, el aumento fue aún más notable con 26 y 75 veces más actividad.

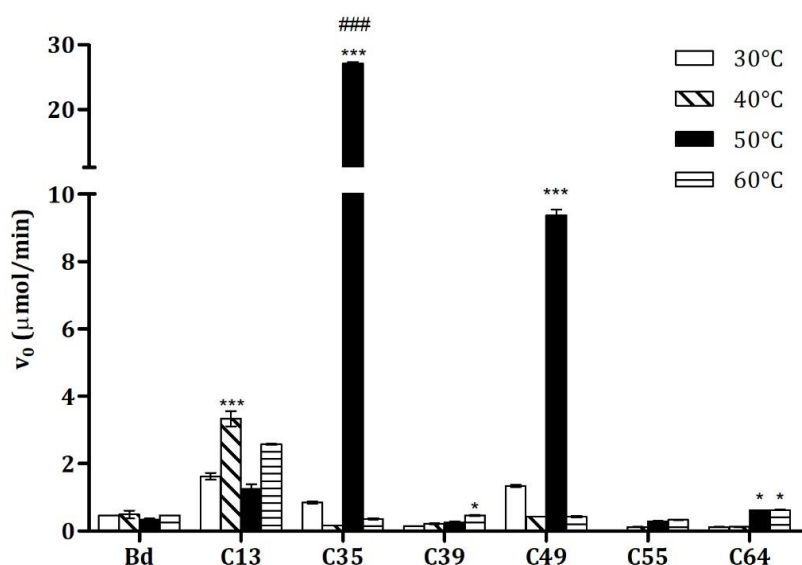


Gráfico 3.4. Variación de la actividad PTE frente a la temperatura.

En base al análisis del comportamiento de la actividad hidrolítica con respecto a diferentes pHs y temperaturas, se combinaron aquellas condiciones en las que se obtuvo mayor actividad, solo se observó un efecto sinérgico cuando se empleó Bd como biocatalizador (Tabla 3.2). Con lo cual se procedió a seleccionar como condiciones optimizadas (OPT) de reacción aquellas en las que se observó mayor actividad PTE (Tabla 3.3.).

Microorganismo	pH ^a	vo (μmol/min)	T (°C)	vo (μmol/min)	Mix condiciones vo (μmol/min)
<i>Bd</i>	8	0,46 ± 0,01	60	0,51 ± 0,02	0,51 ± 0,02
<i>C13</i>	10	2,38 ± 0,05	40	3,42 ± 0,09	2,70 ± 0,03
<i>C35</i>	7	2,55 ± 0,15***	50	27,2 ± 0,2***	14,9 ± 0,1
<i>C39</i>	9	0,50 ± 0,01	60	0,47 ± 0,02	0,23 ± 0,01
<i>C49</i>	8	1,34 ± 0,05***	50	9,3 ± 0,2	9,3 ± 0,2
<i>C55</i>	10	0,19 ± 0,02	60	0,33 ± 0,01	0,29 ± 0,02
<i>C64</i>	6	0,21 ± 0,01	50	0,63 ± 0,01	0,45 ± 0,02

Tabla 3.2. Actividad PTE a pH y temperatura óptimos, y combinación de dichas condiciones.^a Experimentos llevados a cabo a 30°C. ^b Experimentos realizados a pH8.

Microorganismo	Condiciones optimizadas
<i>Bd</i>	pH8 - 60°C
<i>C13</i>	pH8 - 40°C
<i>C35</i>	pH8 - 50°C
<i>C39</i>	pH8 - 60°C
<i>C49</i>	pH8 - 50°C
<i>C55</i>	pH8 - 60°C
<i>C64</i>	pH8 - 50°C

Tabla 3.3. Condiciones optimizadas de reacción para cada microorganismo.

3.2.2.2. Sustrato

Se ha estudiado la hidrólisis de una variedad de OPs de los tipos fosfotriésteres y tiofosfotriésteres empleando como biocatalizador los microorganismos previamente hallados y estudiados, bajo las condiciones estándar y optimizadas determinadas anteriormente.

3.2.2.2.1. MPO, MP, PO.

Considerando la estructura química del MPO, MP y PO es posible observar que los productos obtenidos son el PNF y el dimetil o dietil fosfato (DMP, DEP) dependiendo el OPs (Figura 3.2.), los que no resultan ser tóxicos para el ambiente.

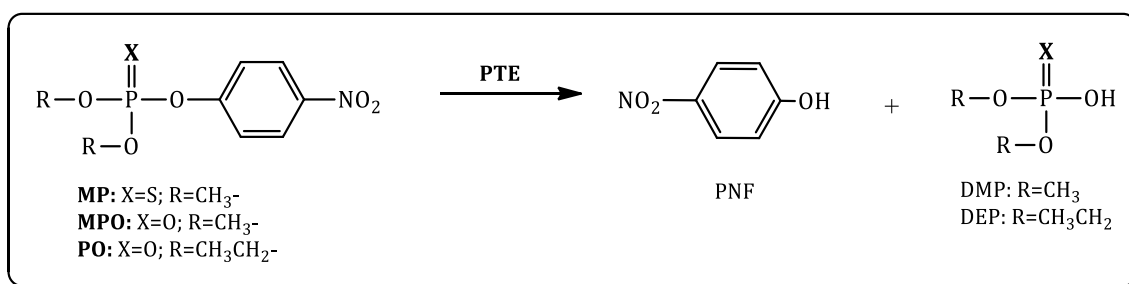


Figura 3.2. Hidrólisis de MPO, MP y PO.

Si bien **MPO** no es aplicado en formulaciones comerciales, en este trabajo ha sido utilizado a fin de caracterizar la aceptación de sustrato de cada uno de los biocatalizadores. En el gráfico 3.5. se observa a modo de resumen las actividades hidrolíticas bajo las condiciones optimizadas propuestas para cada microorganismo. C35

es el microorganismo que exhibió mayor capacidad degradadora por MPO, dentro de los microorganismos *wt* hallados, con 33 veces más actividad que la cepa control, por su parte C49 posee 11 veces más actividad que esta última. Si se comparan las condiciones estándar respecto de las optimizadas es importante destacar las cepas 13, 35 y 49, las que aumentaron su actividad 2, 30 y 10 veces.

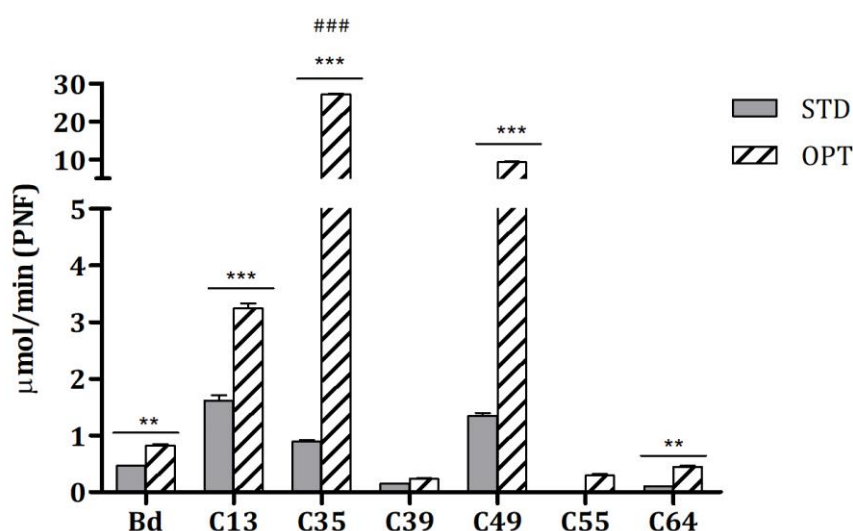


Gráfico 3.5. Velocidad inicial de reacción de la hidrólisis del MPO en condiciones estándar (STD) y óptimas (OPT).

También ha sido analizado como sustrato, el análogo azufrado del MPO, el **MP**. La cepa control, Bd, mostró 3 veces más actividad en condiciones optimizadas, mientras que C13 y C64 mostraron 2 y 10 veces más actividad que el control en las mismas condiciones. El resto de los microorganismos no exhibieron variaciones significativas en su capacidad hidrolítica (Gráfico 3.6.).

En todos los casos la actividad PTE fue menor que con MPO, a excepción de C64, la cual incrementó su actividad y fue el microorganismo que exhibió una mayor V_0 para ese sustrato. Para entender dicha disminución es interesante analizar diferentes aspectos que contribuirían a ello. En primer lugar, si bien estructuralmente MP es similar a MPO, al estar el oxígeno del fosforilo sustituido por un azufre, su reactividad es menor debido a que la electronegatividad de éste es menor con respecto al oxígeno, causando una disminución en el carácter electrofílico del centro fosfórico¹⁵.

Por otra parte, Jackson et al¹⁶, propone que la variación de la polaridad entre el enlace P-S y P-O no es lo suficientemente grande como para modificar la unión al sitio activo. Por lo que se propone el concepto de “unión no productiva”, el cual afecta directamente a la

K_{cat} . Si un sustrato se une al sitio activo de una enzima en una orientación que no permita la hidrólisis, K_m no se verá afectada ya que la afinidad al sustrato se mantiene, sin embargo la K_{cat} disminuirá, ya que el número de enzimas disponibles para catalizar la hidrólisis se verá reducido. En consecuencia, la enzima no podrá llevar a cabo ninguna reacción hasta que el sustrato sea liberado por difusión o se reoriente, siendo ésta una forma de inhibición por sustrato pero que no es fácilmente calculable.

Este fenómeno ha sido reportado para los OPs en diferentes investigaciones realizando mutaciones en aminoácidos no involucrados en el mecanismo de reacción se demostró que las interacciones con la zona hidrofóbica de la cavidad del sitio activo contribuyen a la correcta orientación del sustrato, y por lo tanto mayores velocidades de hidrólisis¹⁷.

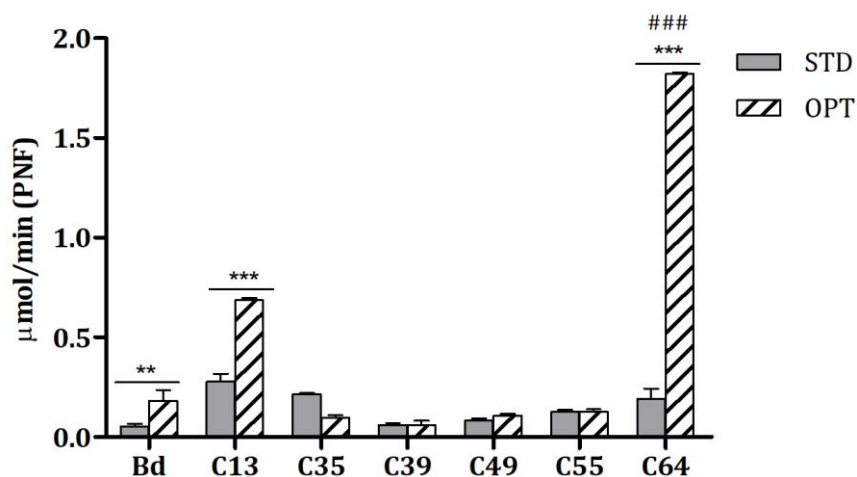


Gráfico 3.6. Velocidad inicial de reacción en la hidrólisis del MP en condiciones estándar (STD) y óptimas (OPT).

El tercer OP estudiado fue el **PO** para el cual las cepas C13, C35 y C49 mostraron 5, 6 y 148 veces más actividad bajo condiciones óptimas respecto de las estándar. Asimismo, se compararon actividades frente a la cepa control Bd, donde C49 y C64 mostraron ser 20 y 3 veces más activos.

Por otra parte, es interesante comparar actividades obtenidas respecto del MPO, observándose que C55 bajo condiciones estándar, y C64 en condiciones optimizadas mostraron ser 16 y 3 veces más activas con PO. El resto de los microorganismos exhibió una menor actividad que con MPO. Dicha disminución se condice con lo reportado por Dornaski et al², los que al evaluar actividad hidrolítica de la PTE de Bd, observaron que el reemplazo de grupos metoxi por etoxi en el sustrato produce un incremento en K_m , y una disminución en catálisis. Adicionalmente, Maxwell y Brench¹⁸ estudiaron la afinidad de los OPs por la acetilcolinesterasa (AChE), y propusieron que esa afinidad está determinada

por su unión a los sitios hidrófobos en el sitio activo de la enzima. Sin embargo, los grupos alcoxi, en particular, aquellos que tienen pequeño número de carbonos serían menos hidrofóbicos, en consecuencia, podrían unirse al sitio activo de manera inespecífica. En este sentido, se producirían uniones no productivas, generando un efecto inhibitorio. Adicionalmente se realizó un estudio molecular dinámico del sustrato dentro del sitio activo de la PTE, y se demostró que el PO puede unirse de forma incorrecta de manera que no puede ser hidrolizado, disminuyendo la k_{cat} ¹⁹.

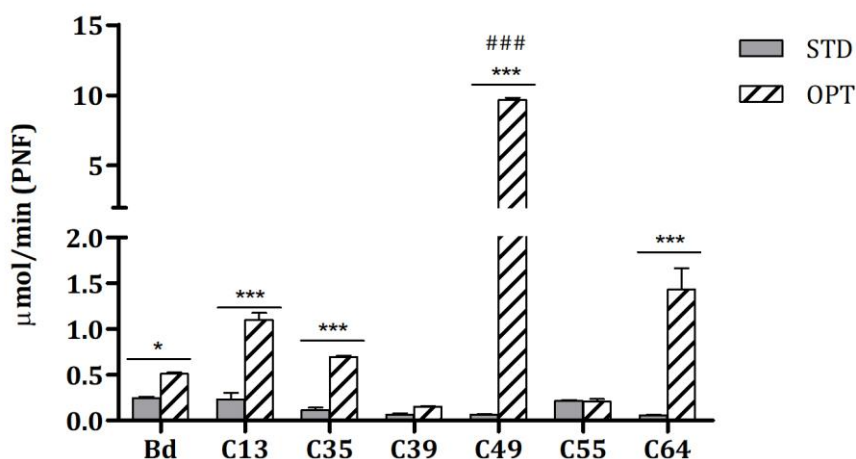


Gráfico 3.7. Velocidad inicial de reacción en la hidrólisis del PO en condiciones estándar (STD) y óptimas (OPT).

3.2.2.2.2. CO, CP

El **CO** ha sido empleado en *screening* de nuevas PTEs^{20,21} considerando que el producto de hidrólisis del CO es el clorferón (CF) (Figura 3.3.), el cual es fluorescente y posee un coeficiente de extinción molar mucho mayor ($\epsilon=22 \times 10^9 \text{ mol L}^{-1}$)¹⁴ que, por ejemplo, el PNF ($\epsilon=17 \times 10^3 \text{ mol L}^{-1}$). Esto representa una ventaja en la búsqueda de nuevas enzimas capaces de degradar OPs, ya que el CF es mucho más sensible en cuanto a su detección.

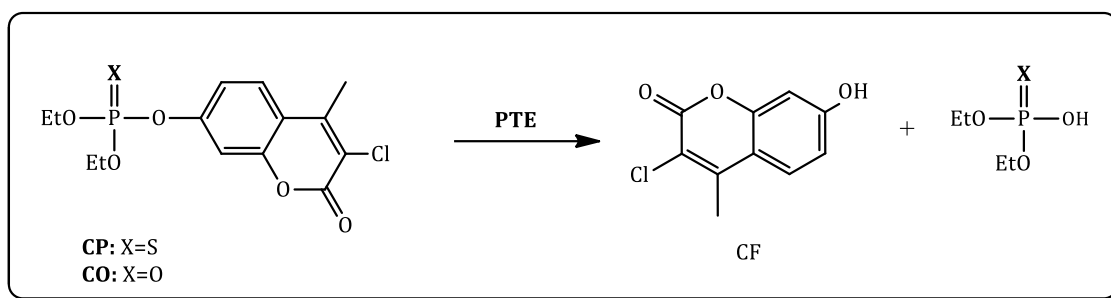


Figura 3.3. Reacción de hidrólisis de CO y CP.

Considerando que ambos OPs son análogos y uno de sus productos de hidrólisis es el CF, inicialmente fueron analizados por absorbancia a 360 nm en HPLC. En la Figura 3.4. se expone a modo de ejemplo cromatogramas obtenidos a partir del análisis de muestras de reacción de hidrólisis catalizada por Bd. La señal correspondiente al CO ($t_R = 3$ min) disminuye en el tiempo mientras que aparece la señal del CF con un t_R de 6 min. Durante el desarrollo de estos ensayos, nuestra universidad adquirió el Cytation 5, Biotek, el cual entre sus funciones cuenta con una lectora de placas que permitía medir fluorescencia. Este nuevo equipamiento permitió el análisis de las muestras de manera más sencilla, rápida y económica, respecto del análisis por HPLC. Por lo tanto los análisis de las muestras obtenidas con estos OPs, fueron analizadas utilizando este último equipamiento.

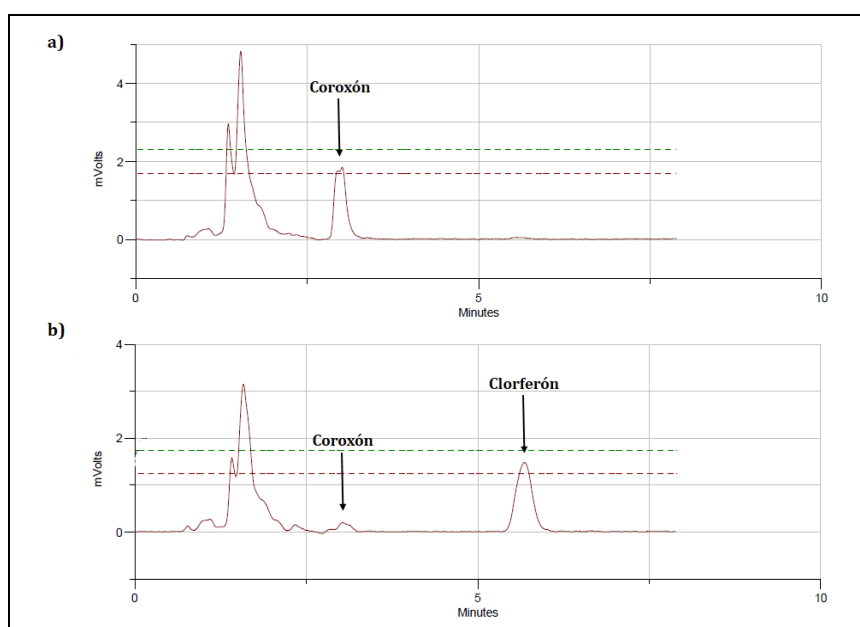


Figura 3.4. Cromatograma de hidrólisis de CO catalizado por Bd
 a) t_0 , al inicio de la reacción; b) t_f , al final de la reacción.

La actividad PTE frente a estos OPs disminuyó respecto de lo exhibido para MPO, PO y MP. Esto puede ser explicado considerando por una parte que tanto el CO y CP son estructuralmente más voluminosos, lo que generaría un efecto estérico y con ello una disminución en la catálisis. En particular para el CO, C49 fue la mejor en condiciones optimizadas exhibiendo 5 veces más actividad que Bd. C13 fue la más activa en la hidrólisis de CP aumentando 3 veces su actividad en condiciones optimizadas y 2 más que la cepa control.

Por su parte cuando se comparan las actividades exhibidas entre estos análogos, se observó, como esperado, que la actividad fue mayor con el oxón. C55 mostró 122 y 138 veces más actividad en condiciones estándar y óptimas respectivamente con CO que con CP. Estos resultados se condicen con lo previamente reportado por Horne²², quien evaluó la actividad hidrolítica de *Pseudomona monteilli* C11 frente a dichos OPs resultando una mayor actividad con CO.

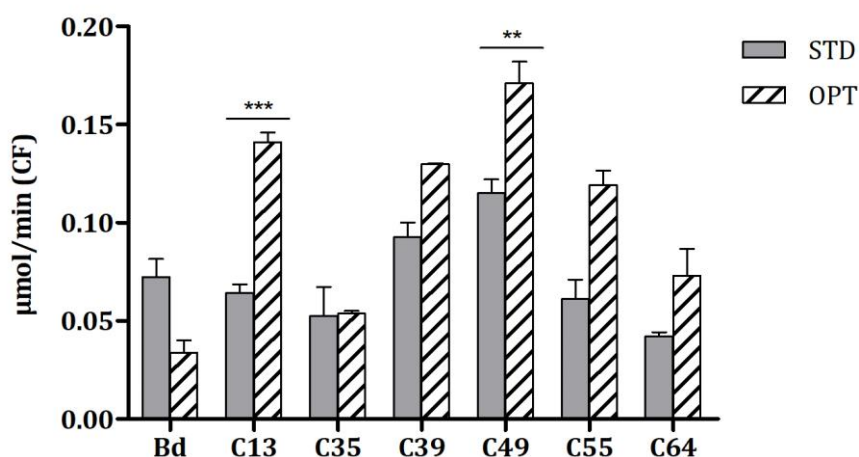


Gráfico 3.8. Velocidad inicial de reacción en la hidrólisis del CO en condiciones estándar (STD) y óptimas (OPT).

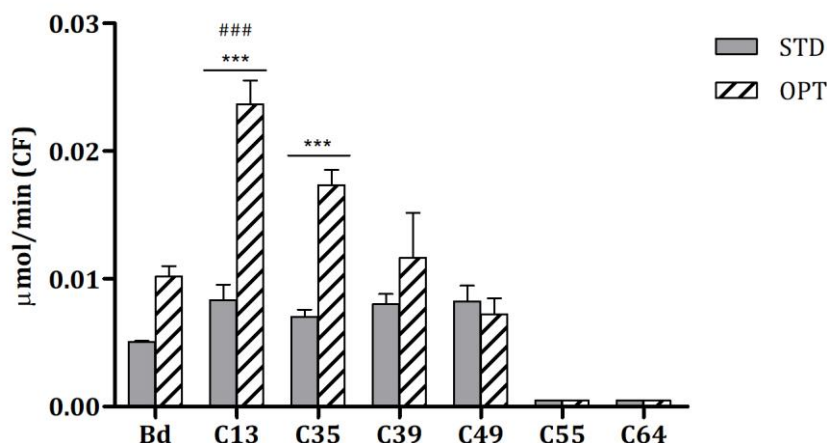


Gráfico 3.8. Velocidad inicial de reacción en la hidrólisis del CP en condiciones estándar (STD) y óptimas (OPT).

3.2.2.2.3. DDVP

La actividad PTE frente al **DDVP** fue relativamente alta, si se la compara con los resultados obtenidos para los OPs oxigenados, la cepa 55 exhibió una actividad 10 veces superior en comparación con el sustrato modelo, MPO. Esto podría deberse a que el DDVP es el OP más pequeño estructuralmente; además el grupo saliente del producto, el diclorovinil alcohol (Figura 3.5.), puede tautomerizar al dicloroacetaldehído (DCA), y al ser muy volátil no se acumularía en el medio de reacción; en consecuencia, podría desplazar el equilibrio favoreciendo la hidrólisis.

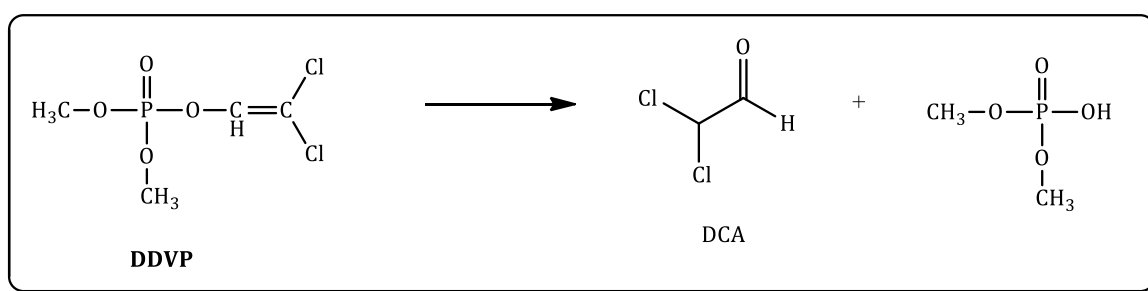


Figura 3.5. Hidrólisis de DDVP.

La cepa 55 fue el biocatalizador que exhibió mayor actividad hidrolítica siendo 100 y 2,5 veces más activa que Bd en condiciones estándar y optimizadas respectivamente. Por su parte C13, C35 y C49 mostraron un incremento de 200 veces en condiciones estándar respecto de la cepa control. Finalmente cuando se comparan las variaciones de actividad

entre ambas condiciones ensayadas, se observó un incremento muy significativo en condiciones optimizadas de 270 veces más que en condiciones estándar para Bd.

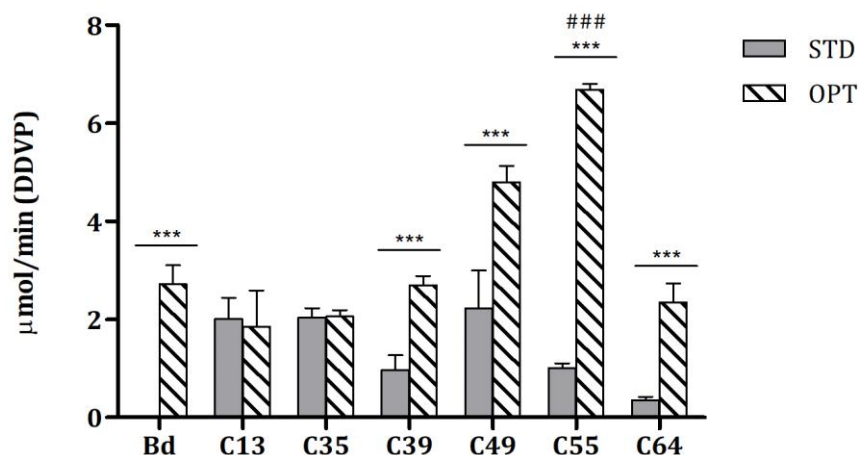


Gráfico 3.9. Velocidad inicial de reacción en la hidrólisis del DDVP en condiciones estándar (STD) y óptimas (OPT).

3.2.2.2.4. CPP

Evaluar CPP como sustrato se presenta especial interés. Por un lado brinda información de la especificidad de sustrato de los biocatalizadores en estudio, pero sobre todo por el interés de obtener algún catalizador eficiente para su degradación considerando su amplia utilización en nuestro país y los problemas que esto acarrea en cuestiones de contaminación ambiental y toxicidad para las personas.

C55, C13, C35 y C39 resultaron los microorganismos con mayor actividad PTE frente al CPP, siendo entre 3 y 2 veces más activos que Bd en condiciones estándar. Cuando se analizaron en condiciones óptimas, la mayoría de los biocatalizadores disminuyeron su actividad respecto de lo obtenido en condiciones estándar, a excepción de Bd y C49 las que duplicaron su velocidad inicial. Estos resultados son controversiales considerando que en condiciones óptimas se esperaba un aumento en la actividad PTE, como se ha observado a lo largo del estudio de la hidrólisis de los diferentes OPs. En consecuencia, resultaría muy interesante, optimizar las condiciones de reacción empleando CPP, ya que las aquí propuestas fueron realizadas con un OP estructuralmente muy diferente.

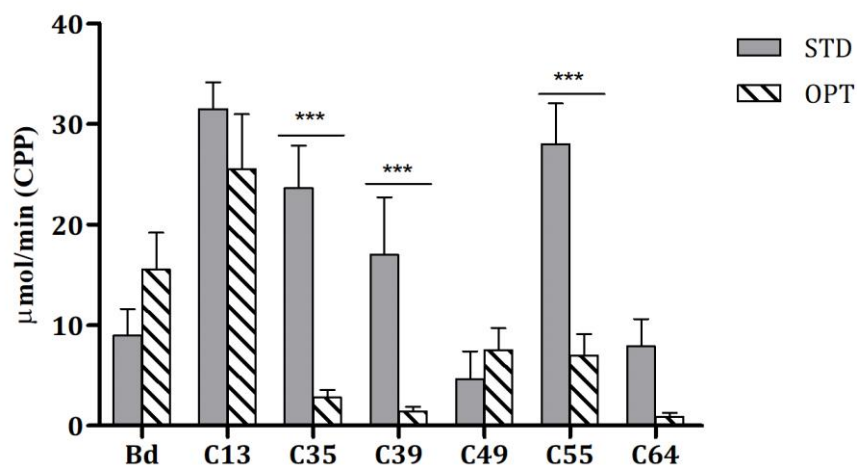


Gráfico 3.11. Actividad hidrolítica frente a CPP en condiciones estándar (STD) y óptimas (OPT).

Tras el estudio realizado, no solo se han puesto a punto las condiciones de reacción de cada biocatalizador, si no que se ha seleccionado un microorganismo capaz de degradar cada uno de los organofosforados eficientemente (Tabla 3.4).

Compuestos organofosforados	Microorganismos	V _o (μmol min ⁻¹)	
		Condiciones estándar	Condiciones optimizadas
MPO	C35	0,887 ± 0,035	27,2 ± 0,2***
PO	C49	0,065 ± 0,01	9,6 ± 0,2***
MP	C64	0,19 ± 0,05	1,821 ± 0,007***
CO	C49	0,12 ± 0,01	0,17 ± 0,02**
CP	C13	0,008 ± 0,002	0,024 ± 0,003***
DDVP	C55	2,24 ± 0,17	3,13 ± 0,83*
CPP	C13	31,5 ± 2,6	25,5 ± 5,4*

Tabla 3.4. Microorganismos capaces de degradar eficientemente cada uno de los OPs.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los OPs representan un gran riesgo de contaminación a escala mundial, siendo los métodos físicos y químicos utilizados para su eliminación muy costosos, como así también contaminantes. Alternativamente la degradación biológica de dichos compuestos se presenta como una opción práctica, económica y amigable con el medio ambiente; sin embargo, una de las principales dificultades de la biorremediación es encontrar la enzima o el microorganismo capaz de realizar la degradación del contaminante. En este sentido, se estudió la actividad PTE de seis microorganismos previamente seleccionados dentro de nuestro cepario. Todos fueron capaces de hidrolizar el sustrato modelo MPO, y las mayores velocidades registradas fueron obtenidas empleando las cepas 13 y 49 que fueron 3 veces más activas que la cepa control.

Al evaluar la influencia de las condiciones de reacción sobre la actividad PTE se observó que a mayor pH la velocidad de hidrólisis aumentó. Adicionalmente, es interesante destacar que la cepa 35 exhibió 13 veces más actividad a pH 6 que el control, siendo de interés ya que la mayoría de las PTEs suelen ser más activas a pH básicos. Por otra parte, no se logró determinar una tendencia definida en cuanto a la variación de la actividad frente a la temperatura de reacción, sin embargo se consiguió incrementar la velocidad de hidrólisis significativamente de las cepas 35 y 49 a 50 °C, alcanzando así un aumento de actividad de 58 y 20 veces respecto de *Bd*. En base a estos ensayos, se combinaron las mejores condiciones de pH y temperatura de cada microorganismo, donde se esperaba observar un efecto sinérgico, lo que sólo ocurrió para *Bd*, aun así, se establecieron condiciones óptimas de reacción para cada cepa.

Todas las bacterias propuestas fueron capaces de degradar los distintos OPs ensayados, y fue posible seleccionar un microorganismo óptimo para cada sustrato tal como lo es *Streptomyces setonii* ATCC 39116 para el MPO, *Nocardia asteroides* ATCC 19296 frente a PO y CO, *Arthrobacter oxydans* ATCC 14359 para el MP, *Arthrobacter oxydans* ATCC 14358 frente a DDVP y *Streptomyces phaeochromogenes* CCRC 10811 para el CPP.

BIBLIOGRAFÍA

1. Singh BK, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol Rev* 2006; **30**:428-471.
2. Dornaski. Structure-Activity Relationships in the Hydrolysis of Substrates by the Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *Biochemistry* 1989; **28**: 4650-4655.
3. Dumas DP, Caldwell SR, Wild JR and Raushel F. Purification and Properties of the Phosphotriesterase from *Pseudomonas diminuta*. *J Biol Chem* 1992; **267**:13278-13283
4. Hindumanthy CK, Gayathri V. Effect of pesticide (Chlorpyrifos) on soil microbial flora and pesticide degradation by strains isolated from contaminated soil. *J Bioremed Biodeg* 2013; **4**(2). DOI: 10.4172/2155-6199.1000178.
5. Dua M, Singh A, Sethunathan N *et al*. Biotechnology and bioremediation successes and limitations. *Appl Microbiol Biot* 2002; **59**:143-52.
6. Rochu D, N Vigui'e, Renault F *et al*. Contribution of the active-site metal cation to the catalytic activity and to the conformational stability of phosphotriesterase: temperature and pH dependence. *Biochem J* 2004; **380**:627-33.
7. Acosta-Martinez V, Tabatabai MA. Enzyme activities in a limed agricultural soil. *Biol Fertil Soils* 2000; **31**: 85-91.
8. Singh BK, Walker A, Wright DJ. Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: influence of different environmental conditions. *Soil Biol Biochem* 2006; **38**: 2682-2693.
9. Singh BK, Walker A, Morgan JA, Wright DJ. Effects of Soil pH on the Biodegradation of Chlorpyrifos and Isolation of a Chlorpyrifos-Degrading Bacterium. *Appl Environ Microbiol* 2003a; **69**: 5198-5206.
10. Singh BK, Walker A, Morgan JA, Wright DJ, Role of Soil pH in the Development of Enhanced Biodegradation of Fenamiphos. *Appl Environ Microbiol* 2003b; **69**: 7035-7043.
11. Schenk G, Mateen I Tee-Kheang N, Pedroso M, Mitić N, Jafelicci M, Marques R, Gahan L, Ollis D. Organophosphate-degrading Metallohydrolases: Structure and Function of potent catalyst for applications in bioremediation. *Coor Chemi Rev* 2016; **317**: 122-131.

12. Islam SM, Math RK, Cho KM *et al.* Organophosphorus Hydrolase (OpdB) of *Lactobacillus brevis* WCP902 from Kimchi is able to degrade organophosphorus pesticides. *J Agr Food Chem* 2010; **58**: 5380–5386.
13. Pompea Del Vecchio. Structural determinants of the high thermal stability of SsoPox from the hyperthermophilic archaeon *Sulfolobus solfataricus*. *Extremophiles* 2009; **13**: 461–470.
14. Merone L, Mandrich L, Rossi M *et al.* A thermostable phosphotriesterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: cloning, overexpression and properties. *Extremophiles* 2005; **9**: 297–305.
15. Hong S and Raushel FM. Metal-Substrate Interactions Facilitate the Catalytic Activity of the Bacterial Phosphotriesterase. *Biochemistry* 1996; **35**: 10904-10912.
16. Jackson CJ, Liu JW, Coote ML, Ollis DL. The effects of substrate orientation on the mechanism of a phosphotriesterase. *Org Biomol Chem* 2005; **3(24)**: 4343-4350.
17. Cho CMH, Mulchandani A, Chen W. Altering the substrate specificity of organophosphorus hydrolase for enhanced hydrolysis of chlorpyrifos. *Appl Environ Microbiol* 2004; **70(8)**: 4681-4685.
18. Maxwell DM and Brench KM. Quantitative structure-activity analysis of acetylcholinesterase inhibition by oxono and thiono analogues of organophosphorus compounds. *Chem Res Toxicol* 1992; **5**: 66-71-
19. Koca J, Zhan CG, Rittenhouse RC, Ornstein RL. Mobility of the active site bound paraoxon and sarin in zinc-phosphotriesterase by molecular dynamics simulation and quantum chemical calculation. *J Am Chem Soc* 2001; **123(5)**: 817-826.
20. Harcourt RL, Horne I, Sutherland TD, Hammock BD, Russell RJ, Oakeshott JG. Development of a simple and sensitive fluorimetric method for isolation of coumaphos-hydrolysing bacteria. *Lett Appl Microbiol* 2002; **34**: 263-268.
21. Santillan JY, Dettorre LA, Lewkowicz ES, Iribarren AM. New and highly active microbial phosphotriesterase sources. *FEMS Microbiol Lett* 2016; **363**: doi: 10.1093/femsle/fnw276.
22. Horne I, Harcourt RL, Sutherland TD, Russell RJ, Oakeshott JG. Isolation of a *Pseudomonas monteilli* strain with a novel phosphotriesterase. *FEMS Microbiol Lett* 2002; **206**: 51-55.

CAPÍTULO 4

“Identificación de bacterias aisladas de suelo y estudio de sus actividades fosfotriesterasa ”

OBJETIVOS

- **Objetivo General**

Obtener nuevas fuentes microbianas con actividad fosfotriesterasa a partir de muestras de suelo.

- **Objetivos específicos**

4. Identificar 2 bacterias previamente aisladas de suelo con actividad PTE.
5. Cuantificar la actividad PTE de los microorganismos capaces de degradar OPs.
6. Optimizar las condiciones de reacción de los microorganismos aislados.
7. Evaluar la aceptación de diferentes OPs como sustratos.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE MICROORGANISMOS CON ACTIVIDAD FOSFOTRIESTERASA

En la naturaleza se han encontrado que los microorganismos evolucionan para ser capaces de degradar ciertas compuestos como resultado de la exposición continua o repetida a sustancias químicas xenobióticas como los OPs¹. Este comportamiento ha dado lugar a una mayor degradación microbiana de muchos productos químicos y, por lo tanto, ha provocado una reducción de la eficacia de varios pesticidas, incluidos los OPs², de hecho las primeras PTE halladas y estudiadas han sido aisladas de muestras de suelo.

En base a ello y con el objetivo de obtener nuevas fuentes bacterianas con actividad PTE, previamente en nuestro laboratorio se habían aislado dos microorganismos con actividad fosfotriesterasa de suelo tratado con clorpirifós y cumafós provenientes del Partido de Daireaux, provincia de Buenos Aires. Para ello se empleó una metodología de aislamiento basada en cultivo por enriquecimiento empleando como selector, pesticidas tiofosfotriésteres como única fuente de fósforo. Se obtuvieron 11 aislamientos, a los cuales se les realizó un ensayo de actividad hidrolítica en medio sólido con coroxón³. Finalmente se obtuvieron 2 aislamientos que mostraron intensidad de fluorescencia adecuada: “CPPR0_6 y CPR6_4”.

4.1.1. *Identificación de los aislamientos*

En colaboración con la Dra. Lorena Rojas y Dr. Daniel Ghiringhelli, del Laboratorio de Ingeniería Genética y Biología Celular y Molecular, Área Virosis de Insectos (LIGBCM-AVI), se identificaron los aislamientos CPR0_6 y CPR6_4 a nivel de género mediante análisis del 16S rDNA.

4.1.1.1. *Amplificación de 16S rDNA*

En la Figura 2.1 puede observarse el análisis de los amplicones obtenidos de las reacciones de PCR mediante electroforesis en geles de agarosa 0,8%, empleando como referencia el *ladder* 1 kb. El producto de las reacciones fue purificado y enviado a secuenciar, empleando los mismos oligonucleótidos usados en la amplificación.

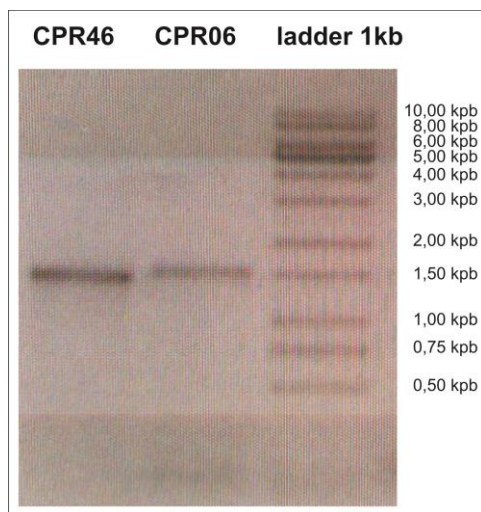


Figura 4.1. Gel de agarosa 0,8%. Se observan los amplicones correspondientes al rDNA 16 S en cada aislamiento.

4.1.1.2. *Secuencias depuradas y corregidas*

Las cuatro secuencias recibidas de la secuenciación fueron depuradas, eliminando las regiones de baja calidad, y los pares de lecturas correspondientes a cada aislamiento fueron ensamblados en los *contigs* correspondientes.

CPR06 16SrDNA (1336 nt, parcial)

```

TTGCTTTTCCTTGAGACCGGCGCACGGGTGCGTAACGCGTATGCAACCTACCCTTTTCTGGGGGATAGCCCG
AAGAAATTTCGGATTAATACCGCATAAGACCACGATACGGCATCGTGACGGGGTCAAACATTTATGGGAGA
AGGATGGGGCATGCGTGCCATTAGCTAGTTGGCGGGGTAACGGCCCCACCAAGGCTACGATGGCTAGGGGAT
CTGAGAGGATGGCCCCCACTGGTACTGAGACACGGACCAGACTCCTACGGGAGGCAGCAGTAAGGAAT
ATTGGTCAATGGGCGCAAGCCTGAACCAGCCATGCCGCGTGACAGGAAGACGGCCCTCCGGGTGTAAACTG
CTTTTGTACGGGAATAAACCTTTCTTCGTGAAGAAAGCTGAATGTACCGTAAGAATAAGGATCGGCTAAC
TCCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGGAGGATCCAAGCGTTATCCGGATTATTGGGTTTAAAGGGTGCGT
AGGCGGCCTGTTAAGTCAGGGGTGAAAGACGGTGGCTCAACCATCGCAGTGCCCTTGATACTGATGGGCTT
GAATGGACTAGAGGTAGGCGGAATGTGACAAGTAGCGGTGAAATGCATAGATATGTCACAGAACACCGAT
TGCGAAGGCAGCTTACTATGGTCCTATTGACGCTGAGGCACGAAAGCGTGGGGATCGAACAGGATTAGAT
ACCCTGGTAGTCCACGCCCTAAACGATGAACACTCGCTGTTGGCGATACACGGTCAGCGGCTAAGCGAAAG
CGTTAAGTGTTCCACCTGGGGAGTACGCCCCGAAGGGTGAAACTCAAAGGAATTGACGGGGGCCGCACA
AGCGGAGGAGCATGTGGTTTAATTTCGATGATACGCGAGGAACCTTACCCGGGCTTGAAAGTTAGTGAAGT
ATCCAGAGATGGATGCGTCCTTCGGGACACGAAACTAGGTGCTGCATGGCTGTCGTCAGCTCGTGCCGTGA
GGTGTTGGGTTAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTATGTCTAGTTGCCAGCATGTAATGGTGGGGGACTC
TAGACAGACTGCCTGTGCAAACAGAGAGGAAGAGGGGACGACGTCAAGTCATCATGGCCCTTACGTCCG
GGGCTACACACGTGCTACAATGGACGGTACAGAGGGCAGCTAGACAGCAATGTCATGCCAATCTCAAAAA
GCCGTTACAGTTTCGGATCGGGGTCTGCAACTCGACCCCGTGAAGTTGGATTTCGCTAGTAATCGCGTATCA
GCAATGACGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTAACACACCGCCCGTCAAGCCATGGAAGTTGGGGG

```

CPR46 16SrDNA (1263 nt, parcial)

AGTTAGTGGCGGACGGGTGAGTAACACGTGGGAACGTGCCTTTAGGTTTCGGAATAACTCAGGGAACTTG
TGCTAATACCGAATGTGCCCTTCGGGGGAAAGATTTATCGCCTTTAGAGCGGGCCGCGTCTGATTAGCTAG
TTGGTGAGGTAAAGGCTCACCAAGGCGACGATCAGTAGCTGGTCTGAGAGGATGATCAGCCACATTGGGA
CTGAGACACGGCCCCAACTCCTACGGGAGGCAGCAGTGGGG AATCTTGCGCAATGGGCGAAAGCCTGACGG
AGCCATGCCGCGTGAATGATGAAGGTCTTAGGATTGTAAAATTCTTTCACCGGGGACGATAATGACGGTA
CCCGGAGAAGAAGCCCCGGCTAACTTCGTGCCAGCAGCCGCGGTAATACGAAGGGGGCTAGCGTTGCTCGG
AATTACTGGGCGTAAAGGGAGCGTAGGCGGACATTTAAGTCAGGGGTGAAATCCCGGGGCTCAACCTCGG
AATTGCCTTTGATACTGGGTGTCTTGAGTATGAGAGAGGTGTGTGGAACCTCCGAGTGTAGAGGTGAAATT
CGTAGATATTCGGAAGAACACCAGTGGCGAAGGCGACACACTGGCTCATTACTGACGCTGAGGCTCGAAA
GCGTGGGGAGCAAACAGGATTAGATACCCTGGTAGTCCACGCCGTAAACGATGATTGCTAGTTGTCTGGGA
TGCATGCATTTCCGTGACGCAGCTAACGCATTAAGCAATCCGCCTGGGGAGTACGGTCGCAAGATTAAAA
CTCAAAGGAATTGACGGGGGGCCGCACAAGCGGTGGAGCATGTGGTTTAATTCCAAGCAACGCGCAGAAC
CTTACCACCTTTTGACATGCCTGGACCGCCAGAGAGATCTGGCTTTCCCTTCGGGGACTAGGACACAGGTG
CTGCATGGCTGTCTGTCAGCTCGTGTCTGAGATGTTGGGTAAAGTCCCGCAACGAGCGCAACCCCTCGCCAT
TAGTTGCCATCATTTAGTTGGGAACTCTAATGGGACTGCCGGTGCTAAGCCGGAGGAA GGTGGGGATGAC
GTCAAGTCCTCATGGCCCTTACAGGGTGGGCTACACACGTGCTACAATGGCGACTACAGAGGGTTAATCCT
TAAAAGTCGTCTCAGTTTCGGATTGTCCTCTGCAACTCGAGGGCATGAAGTTGGAATCGCTAGTAATCGCGG
ATCAGCATGCCGCGGTGAATACGTTCCCGGGCCTTGTACACACCGCCCGTCACACCATGGGAGTTG

En ambos casos, la secuencia sombreada en Amarillo indica una lectura simple (1 sola hebra), mientras que la región sombreada en verde indica una doble lectura (confirmación mediante secuencia directa y complementaria).

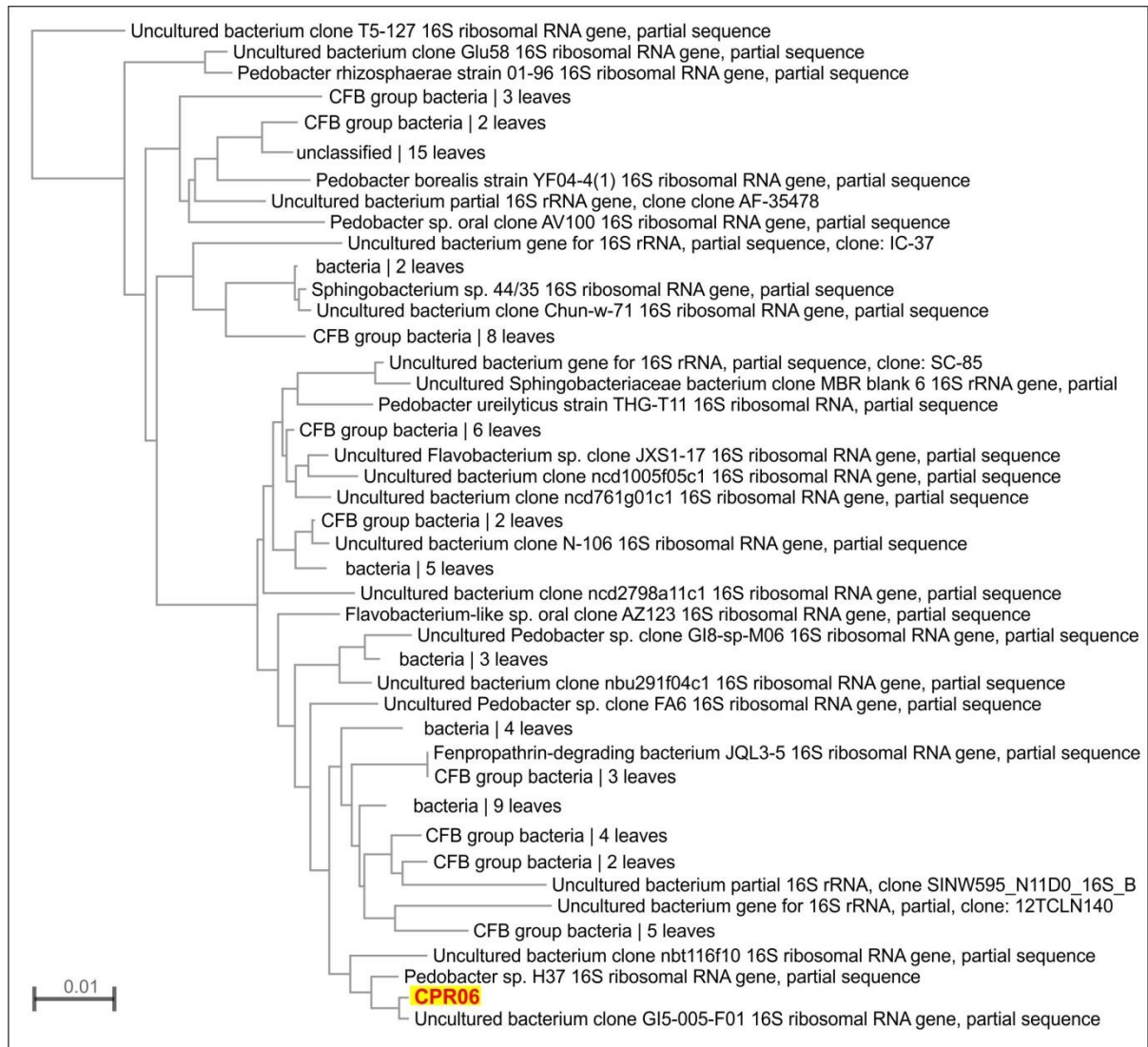
4.1.1.3. Identificación por comparación con Ribosomal Database Project y Silva database.

En la siguiente tabla se presenta la identificación de cada aislamiento en un contexto taxonómico, determinándose que CPR06 se corresponde con una bacteria del género *Pedobacter* (*Pd*) mientras que CPR46 es del género *Brevundimonas* sp.

Sample	database	score/identity	domain	phylum	class
CPR06	RDP	0.982/???	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia
CPR46	RDP	1.000/???	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria
CPR06	Silva	??%/97.76	Bacteria	Bacteroidetes	Sphingobacteriia
CPR46	Silva	??%/100.00	Bacteria	Proteobacteria	Alphaproteobacteria

order	family	genus	name (the most similar known specie)
-------	--------	-------	--------------------------------------

<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Pedobacter</i>	uncultured bacterium; GI5-005-F01; FJ192729
<i>Caulobacteriales</i>	<i>Caulobacteriaceae</i>	<i>Brevundimonas</i>	<i>Brevundimonas</i> sp. V4.BO.07; AJ227800
<i>Sphingobacteriales</i>	<i>Sphingobacteriaceae</i>	<i>Pedobacter</i>	-----
<i>Caulobacteriales</i>	<i>Caulobacteriaceae</i>	<i>Brevundimonas</i>	-----



Uncultured bacterium clone OTU39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain 98 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. VA1 partial 16S rRNA gene, strain VA1

Brevundimonas sp. strain EN14E57 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone 2-31043 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis 16S rRNA gene, strain Asd M7-3

Uncultured bacterium clone EDW07B001_102 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. CCBAU 10915 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain IHBB 11140 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. R3(2014) 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. MC8-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain A3PC5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. Marine-1 partial 16S rRNA gene, isolate Marine-1

Brevundimonas vesicularis strain EGE-B-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. V3M6 partial 16S rRNA gene, strain V3M6

Brevundimonas vesicularis strain JH3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone BD72BR84 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. BYMS20 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone 16slp107-1b09.p1k 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. FXJ8.080 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Caulobacteraceae bacterium NR6 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain FDAARGOS_289, complete genome

Uncultured bacterium clone EDW07B001_133 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone TF85 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone MTWL201306-79 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured alpha proteobacterium clone C1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas nasdae strain W1-2B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain CE39 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain W125 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. GW460-12-10-14-LB2, complete genome

Uncultured bacterium clone EDW07B002_55 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Caulobacteraceae bacterium BFE1B 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone MTWL201306-54 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. YC21R 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. BNA-7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Bacterium strain NS27 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone EDW07B006_35 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. WPCB153 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone EDW07B001_114 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain DCB19 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Caulobacteraceae bacterium HP11H 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. BNA-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. MEB1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas intermedia strain W123 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas nasdae strain R2A7.2-4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas nasdae strain PYGV-3 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Caulobacteraceae bacterium HP4O 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. CHNTR43 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas intermedia gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence

Brevundimonas intermedia strain ATCC 15262 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. AcG 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. JAM-AL06 gene for 16S rRNA, partial sequence

Uncultured bacterium clone MTWL201306-72 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. 7-8 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain R367B/1A 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone EDW07B001_53 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain 266XY4 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas nasdae strain 14D 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain Busing 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. DB-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone AC0C2BE09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone EDW07B001_82 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. MC5-14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. R-37024 partial 16S rRNA gene, strain R-37024

Brevundimonas sp. FrW-Asx16 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence

Brevundimonas nasdae strain P1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. 5420S-28 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. PrLB12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain XFB-BC 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain CSB3-1 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone EDW07B001_63 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. 266XY5 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone EDW07B001_60 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. HINF003 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence

Brevundimonas sp. CmLB14 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone AC1C1BD02 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. B7 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone EDW07B001_58 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

CPR46

Brevundimonas vesicularis strain D67 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain EQH12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone EDW07B001_40 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. Aml 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain KMDH12 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone EDW07B001_90 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. FSBSY13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone 16slp97-1b10.p1k 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone RS-B13 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain L17 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Bacterium ST11(2015) strain ST11 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone EDW07B001_62 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. JPB-1.09 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured bacterium clone EDW07B001_137 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas vesicularis strain KNUC9022 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. V4.B0.05 partial 16S rRNA gene, marine isolate

Brevundimonas vesicularis strain NBRC 12165 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Brevundimonas sp. FrW-Asx5 gene for 16S ribosomal RNA, partial sequence

Uncultured bacterium clone 16slp123-1f04.p1k 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Alpha proteobacterium MBIC3965 gene for 16S rRNA, partial sequence

Brevundimonas nasdae strain 13636E 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

Uncultured organism clone ctg_CGOF287 16S ribosomal RNA gene, partial sequence

0.0007

4.2. CUANTIFICACIÓN DE LA ACTIVIDAD HIDROLÍTICA DE PEDOBACTER (CPR06) Y BREVUNDIMONAS SP (CPR64).

4.2.1. *Reacción de hidrólisis en condiciones estándar*

Se cuantificó la actividad PTE de los microorganismos identificados, para ello inicialmente se evaluó la hidrólisis de MPO en condiciones estándar (pH 8, 30°C). Los ensayos cinéticos realizados, a diferencia de lo realizado experimentalmente para la determinación de V_0 en el capítulo 3, fueron llevados a cabo en *Cytation 5*, dicho equipo permitió ensayar la hidrólisis enzimática y determinar la formación de producto en tiempo real. Para ello la mezcla de reacción fue depositada en placas de 24 pocillos, el equipo fue seteado bajo las condiciones de temperatura y agitación deseadas, como así también la frecuencia de medición de absorbancia por un periodo de 2,5 h.

A modo de ejemplo en el Gráfico 4.1. se observan los reportes provistos por el *Cytation 5* para hidrólisis de MPO con Pd como biocatalizador. Es posible visualizar donde se observa el incremento de la absorbancia (405 nm) a lo largo del tiempo, lo que indica un aumento de la concentración de PNF, con sus respectivas replicas y blancos.

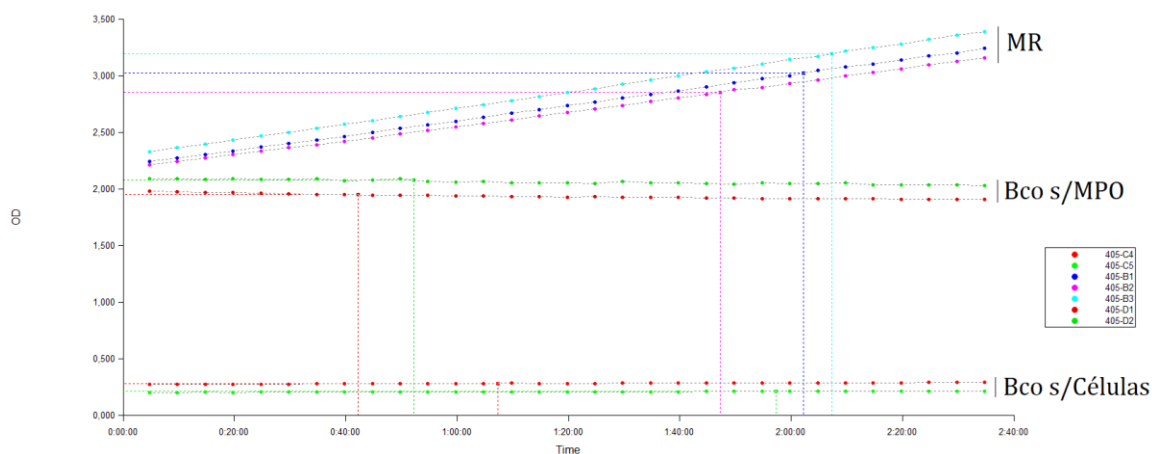


Gráfico 4.1. Resultados obtenidos con *Cytation 5*, del ensayo de actividad hidrolítica empleando como sustrato MPO y Pd como biocatalizador a 30°C, pH 8.

La nueva metodología empleada resultó más sencilla, ampliamente más rápida y que además permitió evitar errores operacionales, en comparación con la metodología empleada en los ensayos previamente realizados. Por lo tanto, se continuó trabajando con esta metodología y se determinaron los valores de V_0 para ambos aislamientos. En el gráfico 4.2. se exhiben los resultados obtenidos, las tasas obtenidas con Pd y Bsp fueron

menores que el control positivo (Bd). Sin embargo, fue de interés continuar su estudio ya que estos microorganismos fueron aislados de suelo tratado con CP, pesticida del tipo tiofosfotriéster, por lo cual es posible que estos microorganismos sean más eficientes en la hidrólisis de estos sustratos.

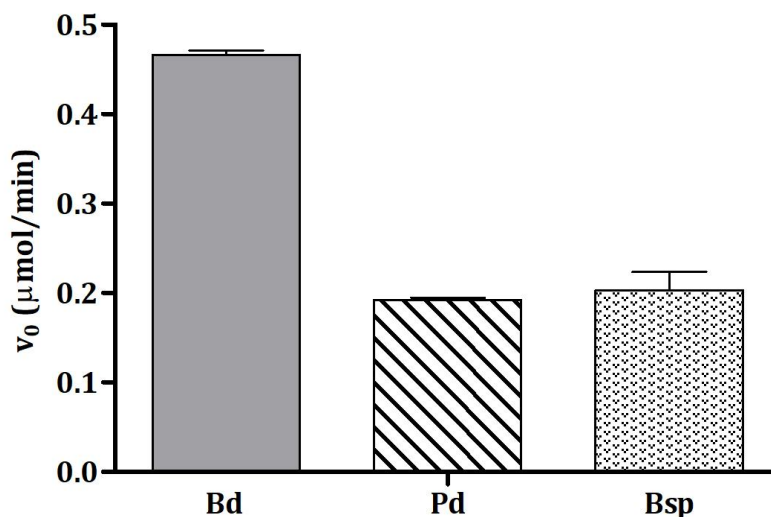


Gráfico 4.2. Actividad hidrolítica de microorganismos aislados Empleando como sustrato MPO en condiciones estándar.

4.2.2. *Determinación de las condiciones de reacción*

Como ya se observó y desarrolló a lo largo de este trabajo, la degradación de OPs depende de numerosos factores entre los que hemos estudiado el pH, temperatura, y el tipo de OPs^{4,5}. Es por ello que se procedió a estudiar dichos parámetros empleando como biocatalizador las bacterias aisladas.

4.2.2.1. *Temperatura y pH*

Para estudiar el efecto del pH y temperatura en la actividad hidrolítica de Pd y Bsp, se ensayó la degradación del MPO como sustrato modelo, en un rango de pHs (pH 6 a pH 10) y temperaturas (30°C a 60°C).

Tal como se observa en el Gráfico 4.3., ambos microorganismos incrementaron aproximadamente 6 veces más actividad a pH 10 respecto del pH 8. Adicionalmente, es interesante destacar que Pd exhibió a pH 6 y pH 7 un incremento de la actividad de 2,5 veces respecto a las condiciones estándar.

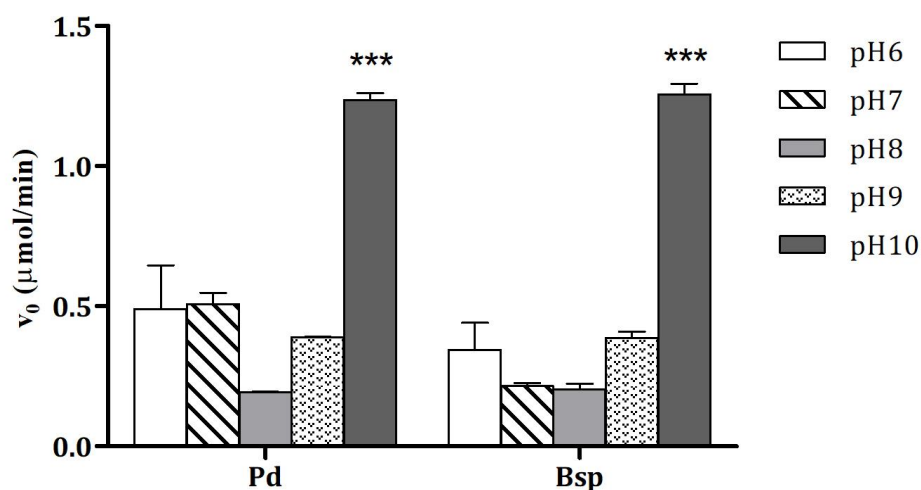


Gráfico 4.3. Actividad hidrolítica frente a diferentes pHs.

Adicionalmente si se comparan los microorganismos aislados, con los resultantes del screening de cepas *wt* (Capítulo 3), a pH 10 tanto Pd como Bsp resultaron hasta 6 veces más activas que los microorganismos *wt* a excepción de C13. La que como se observa en el gráfico 4.4. fue la más activa bajo estas condiciones de pH. Por su parte cuando nos centramos en los resultados obtenidos hacia pHs ácidos, si bien resultaron destacables los valores de V_0 arrojados por las bacterias aisladas a pH 6, y hasta fueron más activos que la mayoría de los microorganismos *wt*, C13 y C35 aún siguen siendo los biocatalizadores más activos en estas condiciones.

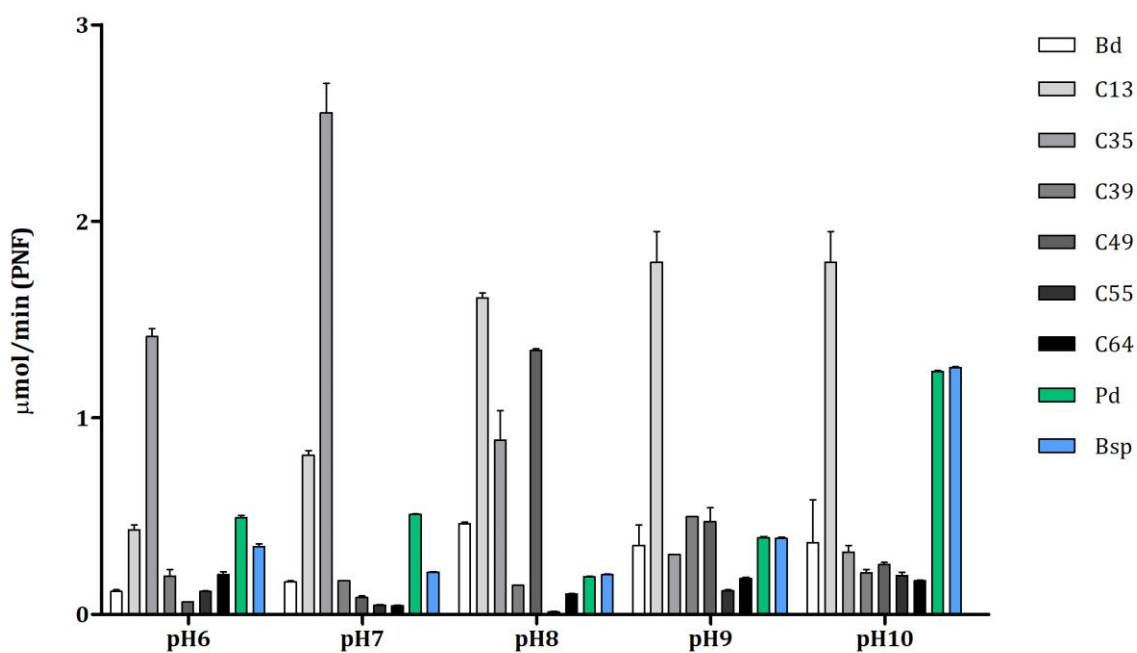


Gráfico 4.4. Actividad hidrolítica frente a diferentes pHs.

Por su parte, cuando se estudió el efecto de la temperatura se observó que conforme incrementó ésta, la actividad PTE también aumentó. Pd y Bsp incrementaron 2 y 3,5 veces su actividad a 60°C respecto de 30°C. Por su parte Pd para el resto de las temperaturas ensayadas no exhibe diferencias significativas respecto de lo observado a 30°C, mientras que Bsp mostró un incremento escalado conforme incrementó la temperatura.

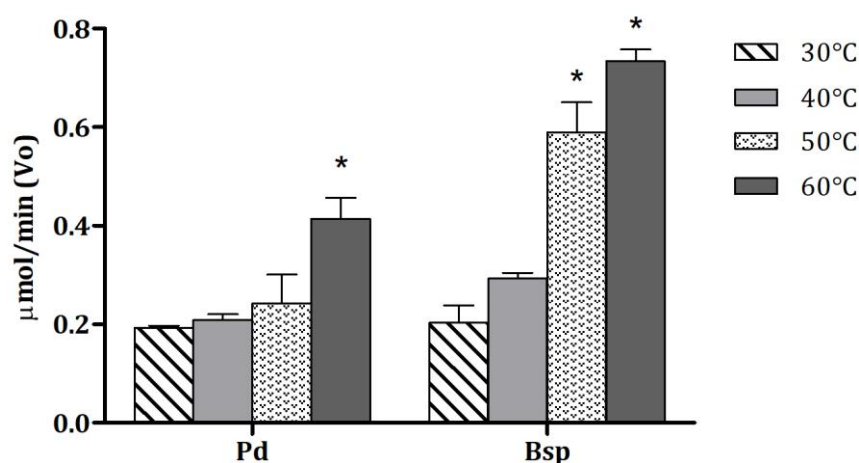


Gráfico 4.5. Actividad hidrolítica frente a diferentes temperaturas.

Nuevamente si se comparan los microorganismos aislados, con los *wt* (Gráfico 4.6.), tanto Pd como Bsp no mostraron ser los más activos bajo cada condición de temperatura. Sin embargo es interesante resaltar que si bien su V_0 es menor que la de C13 a 60°C, ésta fue la temperatura a la cual exhibieron mayor actividad PTE. Estos resultados, son atractivos desde el punto de vista biotecnológico ya que, tanto Pd como Bsp, permiten trabajar en el rango termófilo, proveyendo de enzimas termoestables aplicables a la degradación de OPs en climas extremos. Además, una alta estabilidad térmica generalmente también está vinculada a una alta resistencia a otras condiciones, como la presencia de disolventes, detergentes, etc⁶.

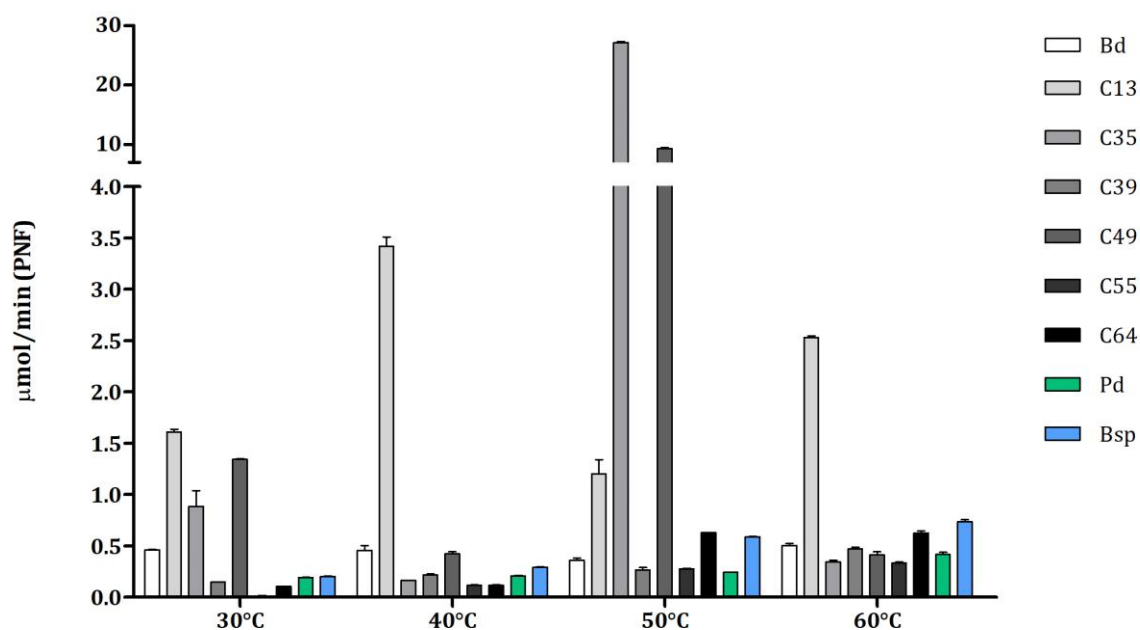


Gráfico 4.6. Actividad hidrolítica frente a diferentes temperaturas.

Para finalizar y determinar las condiciones optimizadas de reacción, se combinó pH y temperatura donde se observó mayor actividad enzimática, a fin de evaluar si al combinarlas la actividad PTE mejoraría aún más.

Se comprobó un efecto sinérgico (Gráfico 4.7.) con un aumento de 32 veces la actividad en condiciones óptimas respecto de las estándar. Por lo tanto para ambos biocatalizadores la condición optimizada de reacción fue pH 10, 60°C.

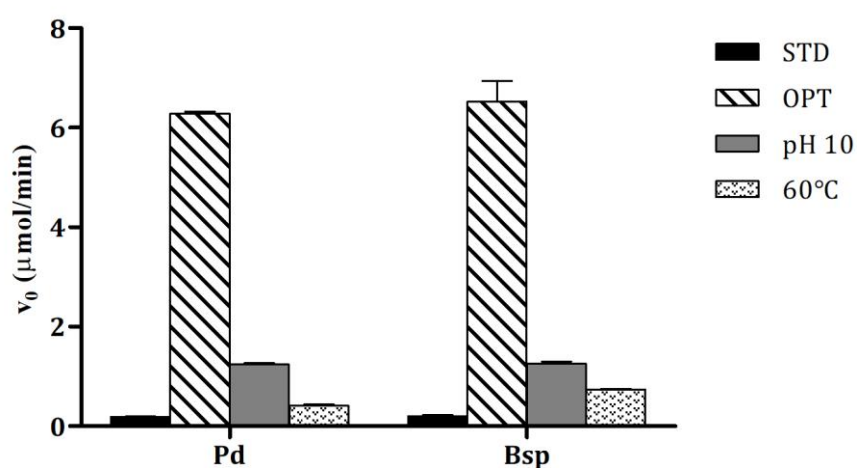


Gráfico 4.7. Mix de pH y temperatura óptimos.

4.2.2.2. *Sustrato*

Otra variable de suma importancia es el tipo de sustrato empleado, por ello se estudió la hidrólisis biocatalizada de diferentes OPs bajo condiciones estándar de reacción, como así también bajo las condiciones de reacción optimizadas previamente.

Bajo condiciones estándar se observó mayor actividad hidrolítica cuando se emplearon como sustrato CO, CP y CPP, respecto de MPO, PO y MP. La diferencia entre estos dos grupos de OPs es que estructuralmente sus grupos salientes son más voluminosos. Estos resultados no son sorprendentes, si se considera que estos microorganismos fueron aislados de suelo tratado con CP, por lo cual es posible que hayan evolucionado para aceptar este tipo de sustratos debido a la constante exposición a él¹. Adicionalmente, si analizamos ambos grupos de OPs, cuando los OPs del tipo oxigenados fueron utilizados, la actividad enzimática fue superior respecto de los tiofosfatos a excepción de los resultados obtenidos para CPP. En general la disminución de la actividad PTE, como bien ya ha sido explicado previamente puede deberse a la menor reactividad de los tiofosfatos⁷.

Por otra parte, cuando la hidrólisis de MPO, PO y MP fueron ensayadas en condiciones optimizadas se observó un incremento aproximado de 32, 7 y 2 veces respectivamente, en contraste con lo determinado para las condiciones estándar. En el caso de CO, CP y CPP, la actividad hidrolítica disminuyó en condiciones óptimas. Nuevamente, aquí es interesante considerar que la puesta a punto de condiciones de reacción se llevó a cabo con un sustrato modelo, MPO, es por esto que probablemente para los OPs estructuralmente similares a éste (PO y MP) la actividad incremente al llevar a cabo los ensayos en condiciones optimizadas respecto de las estándar. Mientras que para los otros OPs ensayados, que como bien ya se mencionó, son estructuralmente diferentes la actividad hidrolítica haya disminuido. Es por ello que sería de interés la puesta a punto de las condiciones de reacción con cada uno de éstos. Adicionalmente es importante considerar que la zona de Daireaux, Bs. As. de donde se aislaron estos microorganismos, posee un clima anual promedio que va desde 10°C a 31°C. El periodo de cultivo en Daireaux normalmente dura entre 8 a 9 meses (270 días), desde aproximadamente septiembre hasta junio, período donde la temperatura va desde los 20°C a 31°C⁸, siendo este rango lo más similar a la condición estándar de reacción ensayada.

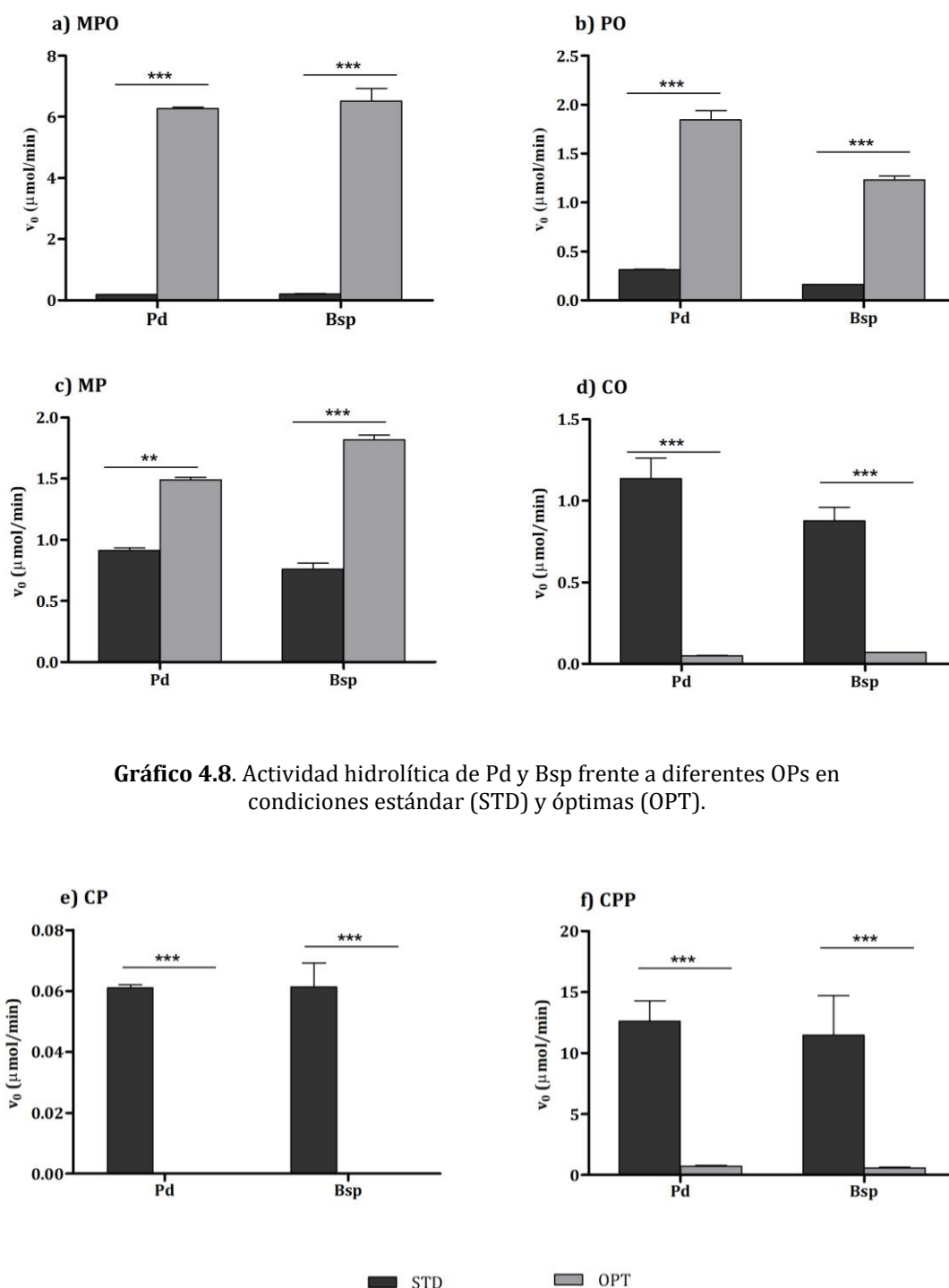


Gráfico 4.8. Actividad hidrolítica de Pd y Bsp frente a diferentes OPs en condiciones estándar (STD) y óptimas (OPT).

Gráfico 4.8. Actividad hidrolítica de Pd y Bsp frente a diferentes OPs en condiciones estándar (STD) y óptimas (OPT).

Por último al comparar los microorganismos *wt* seleccionados como óptimos para cada sustrato bajo condiciones estándar (Capítulo 3) con los resultados obtenidos con los aislamientos aquí estudiados, se observa que estos últimos son aproximadamente 5 veces más activos cuando PO y MP fueron empleados como sustrato, mientras que la diferencia

más destacable se observa en la degradación CO y CP exhibiendo 10 veces más que la actividad PTE que los microorganismos *wt* (Gráfico 4.9. a).

En condiciones optimizadas (Gráfico 4.9. b) los microorganismos *wt* resultaron ser más activos que Pd y Bsp en el caso de la hidrólisis biocatalizada de MPO, PO, siendo la diferencia muy amplia para CPP.

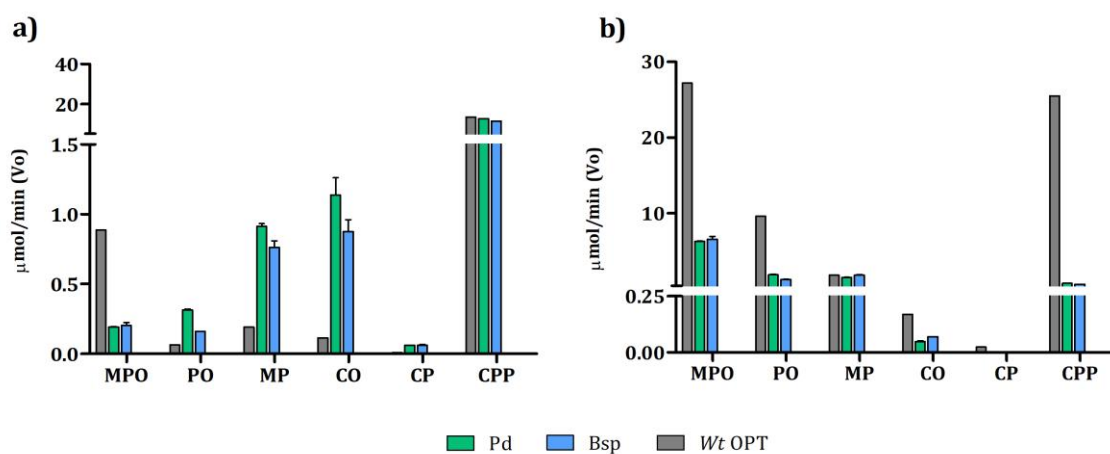


Gráfico 4.9. Actividad hidrolítica de microorganismos *wt*, Pd y Bsp frente a diferentes OPs en a) Condiciones estándar y b) óptimas.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los primeros microorganismos capaces de degradar OPs se aislaron de suelo e identificaron en 1973 como *Flavobacterium sp.* y *Brevundimonas diminuta*⁹. Posteriormente, se aislaron e identificaron numerosos tipos de microorganismos con dicha capacidad, incluyendo bacterias, hongos, algas y cianobacterias¹⁰.

En este marco, es que se propuso obtener microorganismos de suelo tratado con OPs y evaluar la capacidad degradadora de dichos compuestos. A partir de muestras de suelo de un campo de Daireaux, Buenos Aires, Argentina; se aislaron e identificaron dos bacterias con actividad fosfotriesterasa del género *Pedobacter* y *Brevundimonas sp.* Se estudiaron los perfiles de actividad hidrolítica bajo diferentes condiciones de pH y temperatura, empleando como sustrato modelo MPO. Si bien resultaron más activas a pH 10, es también interesante resaltar que fueron activas a pH 6 y 7; siendo de interés la actividad PTE a pHs ácidos, en el tratamiento y decontaminación de ciertos alimentos en proceso de fermentación en medio ácido¹¹. Respecto a la temperatura óptima, los microorganismos aislados fueron más activos a 60°C empleando MPO como sustrato, por lo que estos microorganismos serían termoestables y atractivos para la biorremediación en ambientes termófilos.

Posteriormente, con la finalidad de optimizar aún más la actividad PTE, se combinó el mejor pH y temperatura determinados, observándose un efecto sinérgico, alcanzando un aumento de actividad de 32 veces respecto de las condiciones estándar, determinándose que las condiciones optimizadas fueron pH10, 60°C.

Otro aspecto muy importante evaluado fue la especificidad de sustrato, observándose mayor actividad hidrolítica para OPs estructuralmente más voluminosos tales como: CP, CO y CPP respecto de MPO, PO y MP. Incluso Pd y Bsp fueron 10 veces más activos frente a CO y CP que los microorganismos *Wt* en condiciones estándar. También fueron 5 veces más activos cuando PO y MP fueron empleados como sustrato. Por su parte cuando éstos fueron evaluados bajo condiciones optimizadas la actividad PTE incrementó en la degradación de MPO, PO y MP, mientras que para CO, CP y CPP disminuyó.

Los resultados alcanzados hasta aquí nos permitieron concluir que el ambiente del cual es aislado un microorganismo puede ser determinante en su capacidad hidrolítica, ya que los mejores resultados se observaron para los sustratos del tipo CP, y las condiciones de reacción de este tipo de OPs fue a 30°C, temperatura a la cual se encontraba sometido dichos microorganismos en la naturaleza.

Finalmente es importante resaltar la gran capacidad degradadora de CPP de estos microorganismos, considerando que este pesticida es uno de los más utilizados en nuestro país. Previamente, se han aislado varios genes que codifican a enzimas capaces de degradar OP a partir de microorganismos de diferentes regiones geográficas, algunos de los cuales se ha demostrado que hidrolizan CPP^{12, 13, 14}. También se ha demostrado, se ha demostrado que algunos microorganismos lo degradan co-metabólicamente en medios líquidos^{12, 15}. Singh et al.¹⁶ informaron sobre la degradación mejorada de CPP por la cepa B-14 de *Enterobacter*, degradando 0,075 mM (aproximadamente 25 mg L⁻¹) en 3 días; considerando la V_0 determinada para Pd como biocatalizador en el consumo de CPP, éste podría degradar 0,075 mM en 1 h; siendo notablemente superior.

De esta manera es posible concluir que hemos hallado e identificado microorganismos capaces de ser activos en condiciones de pH ácidos y, que también son altamente eficientes en la degradación de OPs estructuralmente voluminosos, los que en general las PTE más estudiadas no son capaces de degradar. Esta versatilidad y aceptación de sustratos los hacen sumamente atractivos no solo para el tratamiento de aguas y suelos contaminados con OPs, sino también para la decontaminación de alimentos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Chaudhry GR, Ali AN, Wheeler WB. Isolation of a Methyl Parathion-Degrading *Pseudomonas* sp. That Possesses DNA Homologous to the opd Gene from a *Flavobacterium* sp. *Appl Environ Microbiol* 1988; **54**: 288-293.
2. Singh BK, Walker A, Wright DJ. Bioremedial potential of fenamiphos and chlorpyrifos degrading isolates: Influence of different environmental conditions. *Soil Biology & Biochemistry* 2006; **38**:2682–2693.
3. Santillan JY, Dettorre LA, Lewkowicz ES, Iribarren AM. New and highly active microbial phosphotriesterase sources. *FEMS Microbiol Lett* 2016; **363**.
<https://doi.org/10.1093/femsle/fnw276>
4. Ragnarsdottir KV. Environmental fate and toxicology of organophosphate pesticides. *J Geol Soc London* 2000; **157**: 859-876.
5. Dua M, Singh A, Sethunathan N *et al*. Biotechnology and bioremediation successes and limitations. *Appl Microbiol Biot* 2002; **59**:143–52.
6. Merone L, Mandrich L, Rossi M *et al*. A thermostable phosphotriesterase from the archaeon *Sulfolobus solfataricus*: cloning, overexpression and properties. *Extremophiles* 2005; **9**: 297–305.
7. Hong SB & Raushel FM. Metal-Substrate Interactions Facilitate the Catalytic Activity of the Bacterial Phosphotriesterase. *Biochemistry-US* 1996; **35**: 10904-10912.
8. <https://es.weatherspark.com/y/28570/Clima-promedio-en-Daireaux-Argentina-durante-todo-el-a%C3%B1o> 15-1-19
9. Singh B K, Walker A. Microbial degradation of organophosphorus compounds. *FEMS Microbiol Rev* 2006; **30**: 428–471.
10. Kumar S, Kaushik G, Dar MA, Nimesh S, Lopez-Chuken UJ, Villarreal-Chiu JF. Microbial Degradation of Organophosphate Pesticides: A Review. *Pedosphere* 2018; **28**(2): 190–208.
11. Islam SM, Math RK, Cho KM *et al*. Organophosphorus Hydrolase (OpdB) of *Lactobacillus brevis* WCP902 from Kimchi is able to degrade organophosphorus pesticides. *J Agr Food Chem* 2010; **58**: 5380–5386.
12. Mallick BK, Banerji A, Shakil NA, Sethunathan NN. Bacterial degradation of chlorpyrifos in pure culture and in soil. *Bull Environ Contam Toxicol* 1999; **62**(13): 48-55.

13. Racke KD, Coats JR. Pesticides in soil microbial ecosystems. *Am Chem Soc Symp Ser* 1990; **426**: 1-12.
14. Serdar CM, Gibson DT, Munnecke DM, Lancaster JH. Plasmid involvement in the parathion hydrolysis by *Pseudomonas diminuta*. *Appl Environ Microbiol* 1982; **44**: 246-249.
15. Horne I, Setherland TD, Harcourt RL, Russel RJ, Oakeshott JG. Identification of an *opd* (organophosphate degrading) gene in an *Agrobacterium* isolate. *Appl Environ Microbiol* 2002; **68**(10): 3371-3376.
16. Singh K, Brajesh K, Walker A, Alum J, Morgan W, Wright DJ. Biodegradation of chlorpyrifos by *Enterobacter strain* B-14 and its use in biodegradation of contaminated soils. *Appl Environ Microbiol* 2004; **70**: 4855-4863.

CAPÍTULO 5

*“Estudios tendientes a la aplicación en biorremediación
de los biocatalizadores estudiados.
Desarrollo de un biorreactor”*

OBJETIVOS

- **Objetivo General**

Avanzar en el desarrollo de un biorreactor a escala laboratorio para estudiar la potencial aplicación de los biocatalizadores hasta aquí ensayados al tratamiento de aguas contaminadas con pesticidas del tipo organofosforados.

- **Objetivos específicos**

8. Evaluar los extractos enzimáticos provenientes de las fuentes bacterianas estudiadas en este trabajo como biocatalizadores en la degradación de OPs.

9. Inmovilizar por atrapamiento en alginato de calcio tanto las células enteras como el extracto enzimático, y evaluar su actividad fosfotriesterasa.

10. Optimizar la carga de biocatalizador evitando la presencia de limitaciones de transferencia de masa.

11. Diseñar y caracterizar un biorreactor a escala laboratorio para la decontaminación de aguas con pesticidas organofosforados.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.1. INFLUENCIA DE DIFERENTES FORMAS DE BIOCATALIZADOR EN LA ACTIVIDAD FOSFOTRIESTERÁSICA

3.1.1. *Células enteras vs extracto enzimático*

Con el objetivo general de obtener un biocatalizador capaz de ser aplicado en el tratamiento de aguas contaminadas con OPs, se evaluaron como biocatalizadores las células enteras de los microorganismos *wt* seleccionados de acuerdo al sustrato (Tabla 6.1.) y los extractos enzimáticos provenientes de las mismas. Estos extractos se obtuvieron por lisado celular de las bacterias y posterior selección de la porción correspondiente a la fracción de membrana, considerando que en general las PTE bacterianas se encuentran asociadas a la membrana interna.

La reacción de hidrólisis se llevó a cabo bajo condiciones estándar y optimizadas (Tabla 5.1.), y se propuso estudiar la degradación completa de 50 mg L⁻¹ de OPs, considerando que en general dicha concentración promedio es la utilizada en formulaciones aplicadas en la industria agrícola dependiendo el tipo de cultivo a tratar¹.

Compuestos organofosforados	Microorganismos	Condiciones de Reacción	
		Estándar (STD)	Optimizadas (OPT)
MPO	C35	pH8 – 30°C	pH8 – 50°C
PO	C49		pH8 – 50°C
MP	C64		pH8 – 50°C
CO	C49		pH8 – 50°C
DDVP	C55		pH8 – 60°C
CPP	C13		pH8 – 40°C

Tabla 5.1. Condiciones de reacción para la hidrólisis enzimática de cada uno de los OPs propuestos en el capítulo 3.

Inicialmente la reacción de degradación fue llevada a cabo por un período 50 días. En ningún caso se observó la degradación completa, a excepción de la reacción biocatalizada por el extracto enzimático proveniente de C64, el que tras 21 días de reacción en condiciones optimizadas alcanzó un rendimiento del 100%, mientras que con células enteras sólo se obtuvo un 15% de hidrólisis (Gráfico 5.1.).

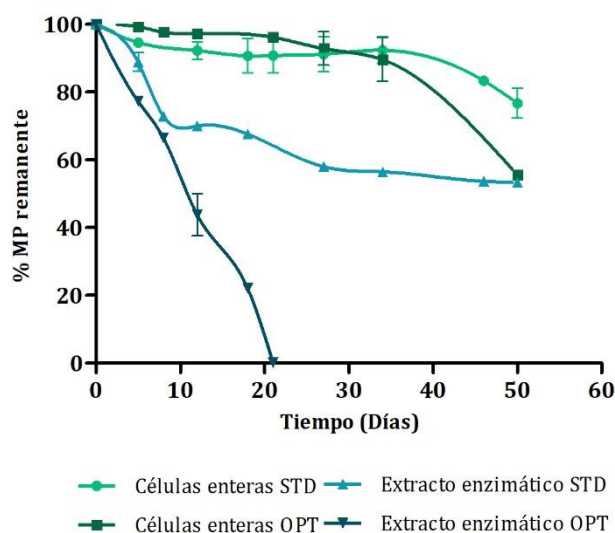


Gráfico 5.1. Reacción de hidrólisis de MP utilizando células enteras y extracto enzimático de C64 en condiciones estándar (STD) y optimizadas (OPT).

Considerando dichos resultados en comparación con los tiempos de reacción reportados en bibliografía², estos últimos exhiben el consumo total en períodos más cortos (entre 14 y 21 días). Por lo que se determinó como tiempo máximo de reacción para el resto de los ensayos el tiempo empleado por C64 para la degradación completa de MP.

Al comparar los resultados obtenidos entre ambas formas de biocatalizador se observa que en general empleando el extracto enzimático la actividad PTE incrementó. Esto puede deberse a la localización de la PTE, en el extracto enzimático ésta se encuentra más accesible para su interacción con el sustrato, debido a que los OPs ya no deberían atravesar la membrana externa para interaccionar con la enzima, y de esta manera sortear dicha limitación. Cuando se evaluó la hidrólisis de CO con el extracto enzimático fue degradado en un 40%, incrementando 2 veces la actividad respecto a lo exhibido con células enteras. Del mismo modo, los extractos enzimáticos de C35 y C49 utilizados como biocatalizador en la hidrólisis de MPO y PO respectivamente bajo condiciones óptimas, alcanzaron hasta un 20% más de degradación.

En los casos en los que la actividad hidrolítica fue menor con el extracto enzimático como biocatalizador, podría deberse a que la lisis celular por sonicación para la obtención de los mismos puede afectar a la estabilidad de las OP hidrolasas. Al estar expuestas al medio, el entorno de la enzima (pH y fuerza iónica) cambia, pudiendo producir la desnaturalización de la misma.

3.1.2. Biocatalizador libre vs inmovilizado

Los biocatalizadores inmovilizados presentan una gran cantidad de ventajas respecto de los libres, incrementando su estabilidad y vida media³. En este sentido y con perspectivas a desarrollar un biorreactor para el tratamiento de aguas contaminadas con pesticidas del tipo organofosforados, se llevó a cabo la inmovilización por atrapamiento. Si bien existen diferentes metodologías de inmovilización, la seleccionada es la más utilizada a la hora de trabajar con células enteras. En este marco la retención física de la célula fue llevada a cabo en alginato de calcio, considerando la experiencia previa del grupo y debido a que es un procedimiento sencillo de realizar⁴.

Para obtener los derivados inmovilizados, a partir de los cultivos bacterianos de C35, C13, C49, C55 y C64 se tomaron $1,2 \times 10^{10}$ células, las que fueron inmovilizadas directamente para la obtención del biocatalizador "*Células enteras inmovilizadas*"; o lisadas por sonicación, y la fracción de membrana resultante finalmente inmovilizada, obteniéndose el "*Extracto enzimático inmovilizado*". Una vez preparados los biocatalizadores, su actividad hidrolítica fue analizada determinando los porcentajes de degradación a los 21 días de reacción.

Comparando los resultados conseguidos para los biocatalizadores libres (Células enteras y extracto enzimático) con los de los inmovilizados, se observó que la actividad hidrolítica fue inferior tanto en condiciones estándar como optimizadas (Gráfico 5.2). Esto podría deberse a limitaciones de transferencia de materia, siendo ésta una de las principales desventajas de trabajar con biocatalizadores inmovilizados. Adicionalmente, no se observaron variaciones significativas en el porcentaje de degradación si se comparan ambos catalizadores inmovilizados, a excepción de las células enteras inmovilizadas de C13 en la hidrólisis de CPP bajo condiciones optimizadas, que exhibe un 75% de degradación de sustrato mientras que el extracto enzimático inmovilizado solo el 20%. Del mismo modo las células enteras inmovilizadas degradaron CPP 75 veces más en condiciones optimizadas respecto de lo exhibido en condiciones estándar.

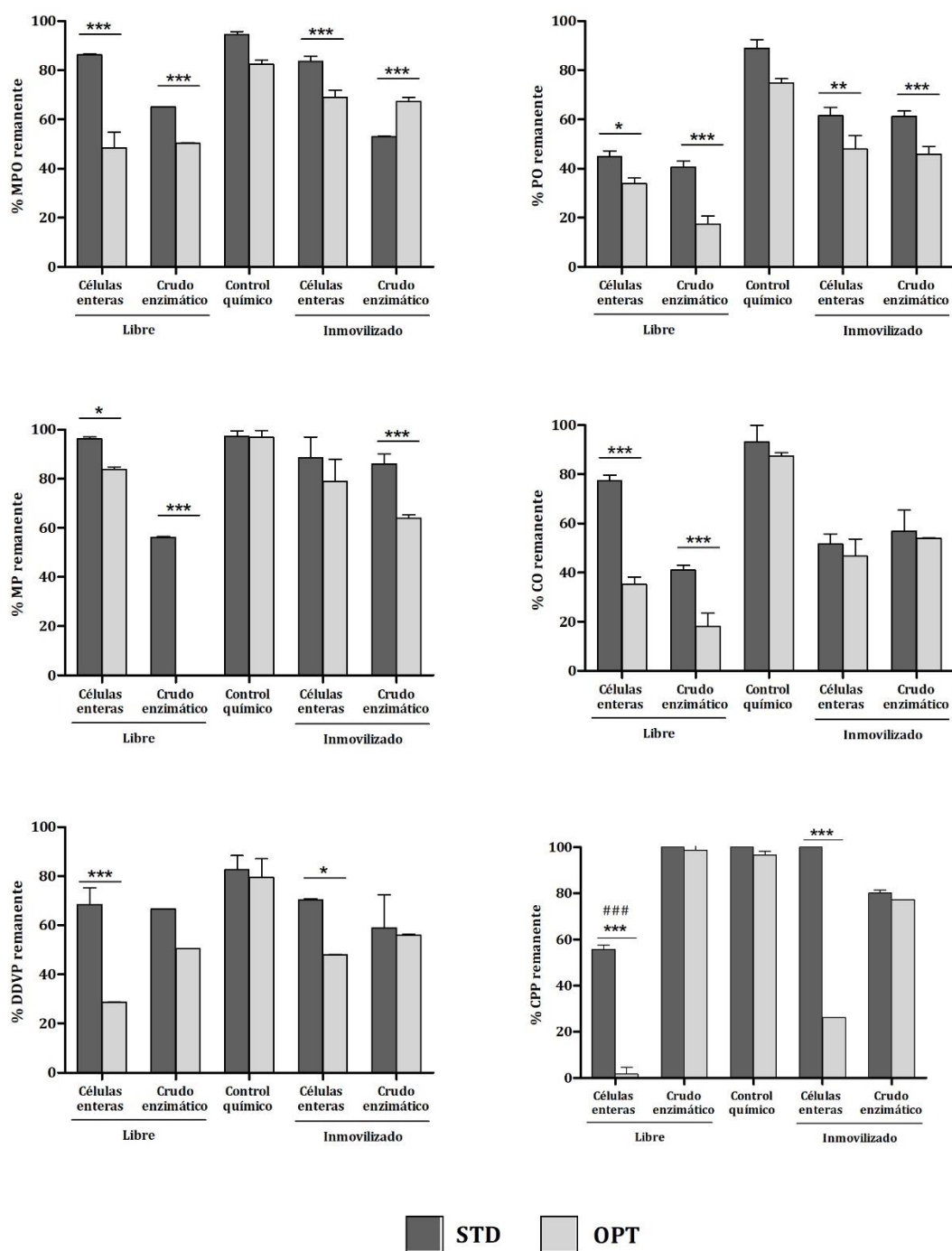


Gráfico 5.2. Porcentaje de OPs remanente luego de 21 días de reacción utilizando diferentes formas de biocatalizadores en condiciones estándar (STD) y optimizadas (OPT).

3.1.3. Optimización de la carga del biocatalizador inmovilizado

Para trabajar con derivados inmovilizados como catalizadores es de interés encontrar condiciones de trabajo en las que la carga enzimática contenida en el soporte sea la máxima posible sin que aparezcan limitaciones en la transferencia de masa.

Para ello, en base a los resultados previamente obtenidos, se exploró la selección del biocatalizador inmovilizado que exhibiera el mayor porcentaje de degradación para cada OP. En la mayoría de los casos el extracto enzimático mostró mayor porcentaje de degradación que las células enteras, aunque la diferencia no era significativa. Por lo que, al evaluar “costo-rendimiento” se seleccionaron las células enteras debido a que, en cuestiones de costo, la obtención del extracto enzimático involucra un paso más en lo experimental, y la obtención final de un 5% más de degradación, no es relevante. Es por ello que los biocatalizadores seleccionados fueron:

Compuestos organofosforados	Biocatalizador inmovilizado
MPO	Extracto enzimático proveniente de C35
PO	Células enteras, C49
MP	Células enteras, C64
CO	Células enteras, C49
CP	Células enteras, C13
DDVP	Células enteras, C55
CPP	Células enteras, C13

Tabla 5.2. Biocatalizadores inmovilizados seleccionados para la degradación de OPs en base a los resultados obtenidos en sección 6.1.2.

De acuerdo a los ensayos realizados hasta esta instancia, se consideró como punto de partida la inmovilización de 2×10^9 células cada 2,5 mL de soporte (1X). Para comprobar la influencia en la degradación al incrementar la carga de biocatalizador y determinar el efecto de la transferencia de masa, se analizó el porcentaje remanente de OPs tras 21 días de reacción utilizando 2, 4, 6 y 10 veces más la cantidad de biocatalizador (célula/extracto enzimático) inmovilizado respecto del 1X.

En todos los casos se observó un decaimiento en la capacidad de degradación del biocatalizador inmovilizado al incrementar la carga enzimática pudiendo estar ligado con posibles problemas de transferencia de masa, al haber mayor cantidad de biocatalizador por mL de soporte es posible que exista alguna limitación en el acceso del sustrato a la enzima, probablemente haya menor superficie de la célula expuesta al medio para el ingreso del sustrato a la misma. Por su parte las células enteras de C55 inmovilizadas empleadas en la hidrólisis de DDVP fueron la excepción, ya que en este caso, conforme se

incrementó la cantidad de biocatalizador la actividad incrementó alcanzándose el doble cuando se empleó 10X. Este ensayo permitió deducir que, entre las cargas enzimáticas ensayadas, el trabajar con 2×10^9 células (1X) sería el límite operacional en la relación carga de biocatalizador por mL de soporte, a excepción de C55 (10X).

Al observar que aumentando la cantidad de biocatalizador en la mayoría de los casos la actividad no aumenta, sería de importancia evaluar menores cantidades, ya que quizá sería posible alcanzar mejores o iguales porcentajes de degradación con menor carga de biocatalizador por mL de soporte.

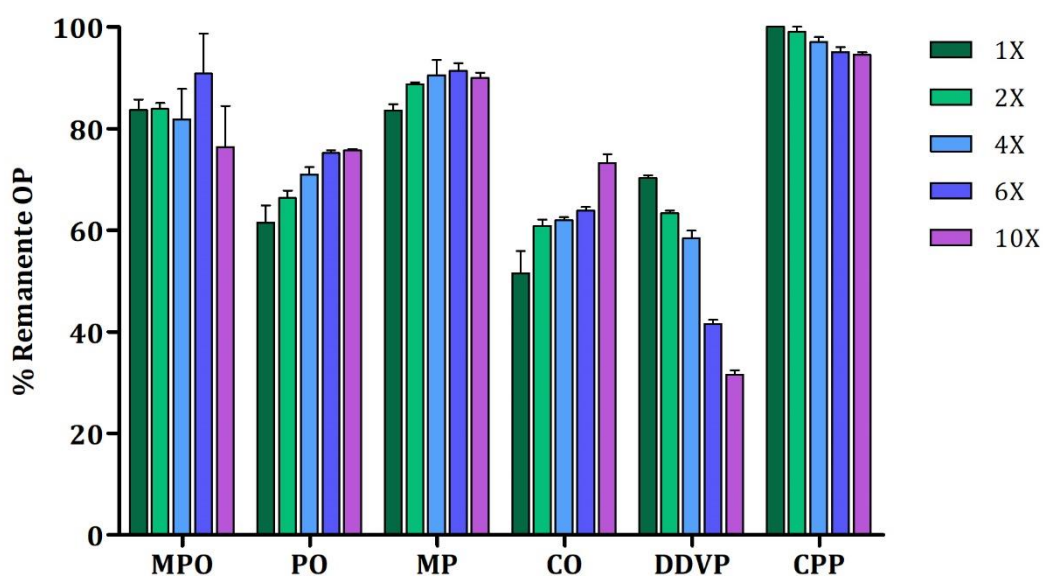


Gráfico 5.3. Influencia de la carga de biocatalizador células enteras inmovilizadas por mL de soporte en la degradación de los OPs propuestos en condiciones estándar.

5.2. DISEÑO DE UN BIORREACTOR PARA EL TRATAMIENTO DE AGUAS CONTAMINADAS CON PESTICIDAS ORGANOFOSFORADOS

Los tratamientos biológicos han cobrado gran interés en los procesos de depuración de aguas residuales, aprovechando la capacidad de los microorganismos de degradar, acumular, adsorber o precipitar una gran variedad de contaminantes presentes en aguas o efluentes. Es por ello que una vez estudiados y caracterizados como biocatalizadores en la hidrólisis de OPs las células enteras y el extracto celular inmovilizados de diferentes microorganismos, se procedió al armado y caracterización de un biorreactor.

A diferencia de lo que ocurre con equipos para procesos de transferencia de masa o de calor, no existe una metodología para el diseño de equipos dentro de los cuales se desarrolle una reacción o conversión bioquímica, debido principalmente a que el diseño

del biorreactor estará regido por el sistema de reacción específico y el tipo de microorganismos que se emplee. En el armado del biorreactor a emplear en este trabajo se tuvo en cuenta la obtención de un biocatalizador funcional y eficiente para la conversión de interés y su aplicación en el mismo. Es por ello que fueron estudiadas las condiciones de reacción (pH, temperatura y sustrato), la inmovilización (carga de biocatalizador) y reutilización del biocatalizador; como así también la distribución de los tiempos de residencia y el tipo de flujo en el reactor.

El biorreactor fue evaluado inicialmente en la degradación de PO considerando que el producto de hidrólisis era fácilmente cuantificable, como así también por ser uno de los OPs más estudiados. Posteriormente, fue empleado en la degradación de CPP, ya que es el OP más utilizado en nuestro país y en el mundo como pesticida.

5.2.1. Condiciones de operación del sistema

5.2.1.1. Temperatura

Existen reportes del uso de biocatalizadores mesófilos y termófilos en biorreactores para el tratamiento de aguas residuales dependiendo del tipo de reactor. Por ejemplo, se ha diseñado un biorreactor anaeróbico de lecho expandido granular el cual ha producido la degradación total de pesticidas tanto a 35°C como a 55°C. Si bien esta última condición involucra un costo energético debido a la calefacción del sistema, presenta la ventaja adicional de generar un 35% más de metano, subproducto de la reacción, lo que hace al proceso económicamente rentable⁵. Por su parte también se han inmovilizado OP hidrolasas termoestables en membranas del tipo hidrofílicas e hidrofóbicas para el tratamiento en biorreactores de agua en forma líquida y vapor⁶.

Particularmente nuestro laboratorio cuenta con la experiencia en reactores del tipo batch y lecho empaquetado, por lo que contábamos con reactores de estos tipos. Para su utilización y considerando el objetivo de este trabajo se seleccionó el reactor de columna, para el desarrollo de un lecho empaquetado con los microorganismos previamente inmovilizados que fueron estudiados en condiciones estándar y optimizadas. Considerando el tipo de reactor disponible, el costo energético de trabajar bajo las condiciones estudiadas, y un futuro escalado del mismo, es que se decidió finalmente trabajar en condiciones estándar (30°C), este sistema a diferencia del reactor anaeróbico mencionado, no prevé la subproducción de compuestos que lo hagan rentable al trabajar a temperaturas elevadas.

5.2.1.2. Biocatalizador

5.2.1.2.1. Selección del biocatalizador

En base a los resultados previamente obtenidos del estudio de la hidrólisis con los biocatalizadores inmovilizados para la degradación de PO, se trabajó con células enteras inmovilizadas de C49 (Tabla 5.2). Por su parte, para la degradación de CPP se observó que en condiciones estándar el biocatalizador “células enteras inmovilizadas de C13” no fue capaz de degradar CPP, mientras que el “extracto enzimático inmovilizado de C13” solo exhibió un 20% de degradación. Por lo que resultó interesante considerar los microorganismos aislados de suelo debido a que estos biocatalizadores libres mostraron valores de V_0 similares a lo obtenido para C13 (Gráfico 4.9., Capítulo 4).

Si bien ambos eran atractivos considerando las velocidades iniciales exhibidas, *Pedobacter* se presenta como un catalizador novedoso, ya que no ha sido reportado en dicha catálisis a diferencia de *Brevundimonas*, que ha sido uno de los microorganismos más estudiados como fuente de PTE desde que se reveló dicha actividad. Por lo que, finalmente se decidió estudiar las células enteras y los respectivos extractos inmovilizados de Pd.

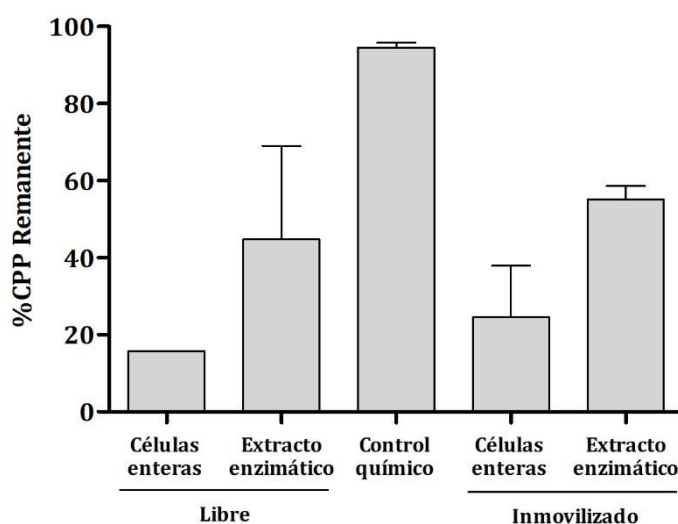


Gráfico 5.4. Porcentaje de CPP permanente luego de 21 días de reacción utilizando diferentes formas de Pd en condiciones estándar.

Tras el análisis de los resultados expuestos en el gráfico 5.4. respecto de lo obtenido con C13 (Gráfico 5.2) todas las formas de biocatalizador de Pd mostraron ser más eficientes en la degradación de CPP. En consecuencia el biocatalizador seleccionado para

emplear en el biorreactor fue Pd. Posteriormente con el fin de elegir una forma de biocatalizador entre células enteras y extracto enzimático inmovilizado, se compararon los porcentajes de degradación de CPP, observándose que el primero alcanzó un 75%, mientras que el extracto un 40%. En resumen, las células enteras inmovilizadas de Pd fueron seleccionadas como biocatalizador a ser empleadas en el reactor para la degradación de CPP.

Finalmente al evaluar el incremento de la carga enzimática por mL de soporte (2X, 4X, 6X y 10x), no se observaron incrementos significativos al igual que en la mayoría de los biocatalizadores *wt*.

5.2.1.2.2. Estudio de transferencia de materia a través del biocatalizador inmovilizado

Las velocidades de reacción y la transferencia de materia no son independientes. Considerando que el biocatalizador se encuentra inmovilizado en un polímero de gel (perlas), y que este debería permitir la difusión de los reactivos y productos desde y hacia el interior de la partícula, uno de los objetivos fue determinar la influencia relativa de la transferencia de materia en la velocidad de reacción⁴.

En primera instancia se determinó el tipo de comportamiento cinético para los dos biocatalizadores propuestos. Para ello se calcularon las velocidades iniciales a distintas concentraciones de sustrato tanto para el biocatalizador libre como para el inmovilizado. Del análisis estadístico por regresión no lineal se determinó que ambos se ajustaban a una curva del tipo enzimática michaeliana (Gráfico 5.5.). De la misma forma, se determinaron los parámetros cinéticos, K_m y $V_{m\acute{a}x}$ (Tabla 5.3). Tras la comparación entre los valores de K_m del biocatalizador libre respecto del inmovilizado se desprende, como una primera aproximación, que existiría algún tipo de problema de transferencia de masa en el biocatalizador inmovilizado de C49 para la degradación de PO ya que el incremento en dicho parámetro puede adjudicarse a un menor acceso del sustrato a la enzima. Por su parte, los valores de K_m arrojados para los biocatalizadores de Pd no presentan diferencias significativas por lo que el biocatalizador inmovilizado no presentaría problemas de transferencia de masa.

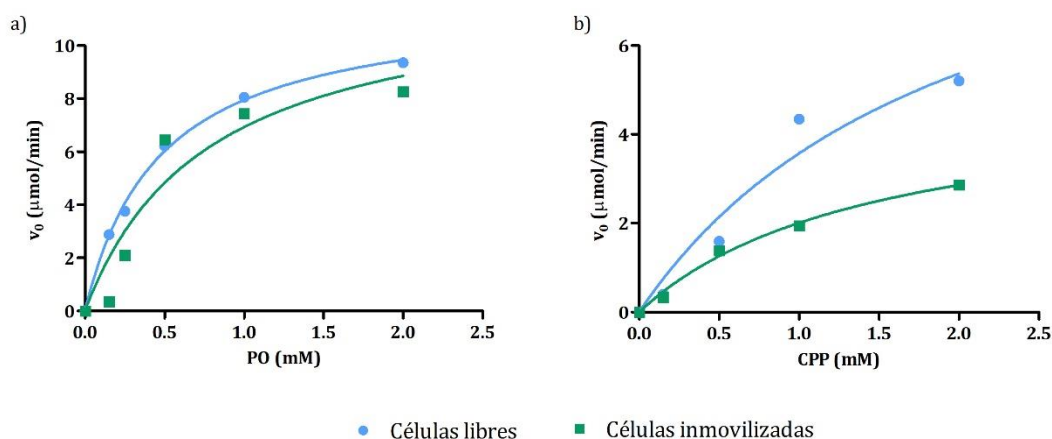


Gráfico 5.5. Determinación del comportamiento enzimático utilizando biocatalizadores libres e inmovilizados para la hidrólisis de a) PO y b) CPP.

Para la determinación puntual de problemas de transferencia de materia sea interno o externo del biocatalizador inmovilizado de C49, existen diferentes parámetros que dan cuenta de ellos. Por ejemplo el factor de efectividad interna, permite calcular la relación entre la velocidad de reacción observada ($r_{A,obs}$) del biocatalizador inmovilizado respecto de la velocidad que ocurriría en cualquier punto de la partícula. Si dicho valor es igual a 1, estaríamos en ausencia de limitaciones debidas a transferencia de materia. Sin embargo, no es posible determinar este factor para las reacciones del tipo michaelianas, ya que para el cálculo de la $r_{A,obs}$ no se dispone de una ecuación para determinar la concentración del sustrato en la superficie exterior de la partícula en función del radio. Lo mismo ocurre si se quiere determinar el módulo observable para la transferencia de materia, en general las ecuaciones de difusión-reacción para cinéticas de este tipo se resuelven mediante métodos numéricos realizados por programación⁴. A fin de minimizar los inconvenientes de transferencia de materia, inicialmente sería posible evaluar perlas de alginato de menor tamaño de modo que bajo la misma cantidad de soporte y células la superficie de interacción para la transferencia de materia sea mayor.

	C49 entera inmovilizada (PO)		Pd entera inmovilizada (CPP)	
	<i>Libre</i>	<i>Inmovilizada</i>	<i>Libre</i>	<i>Inmovilizada</i>
V_{máx}	11,68 ± 0,36	12,28 ± 0,35	4,97 ± 0,27	10,81 ± 0,47
Km	0,47 ± 0,04	0,77 ± 0,05	1,48 ± 0,27	1,03 ± 0,89
R²	0,9974	0,9010	0,9579	0,9902

Tabla 5.3. Parámetros cinéticos para biocatalizadores. libres e inmovilizados en la hidrólisis de PO y CPP,

5.2.2. Detección y seguimiento de las reacciones llevadas a cabo en biorreactor

A lo largo del proceso de degradación de OPs en el biorreactor, se colectaron muestras del reservorio que fueron analizadas según el OP en cuestión.

5.2.2.1. Paraoxón

Tal como se mencionó a lo largo de este trabajo, PO al ser hidrolizado libera como producto de reacción PNF, siendo éste fácilmente detectado por espectrofotometría a 405 nm. Empleando una curva de calibración de PNF fue posible determinar la concentración del mismo, como así también indirectamente calcular el porcentaje de sustrato consumido. Dichos resultados pueden observarse en el gráfico 6.6. en el que se exhiben los resultados obtenidos en el primer uso del biorreactor, observándose el consumo total de PO tras 56 h.

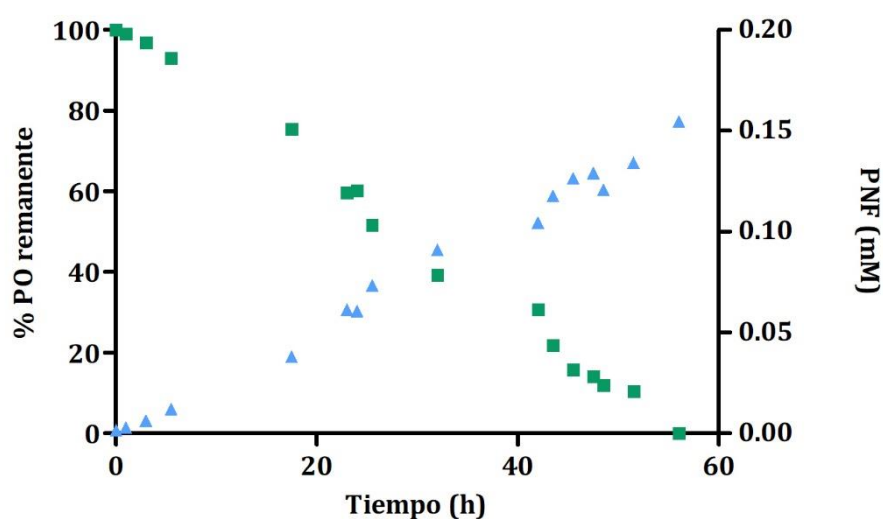


Gráfico 5.6 Cuantificación de la formación de PNF y % de degradación de PO respecto del tiempo.

5.2.2.2. Clorpirifós

La degradación de clorpirifós fue determinada por consumo de sustrato, analizando las muestras por HPLC. En la siguiente figura se exhiben los cromatogramas obtenidos tras el análisis de las muestras a tiempo inicial y final, del primer ciclo de uso del reactor para tratamiento de CPP.

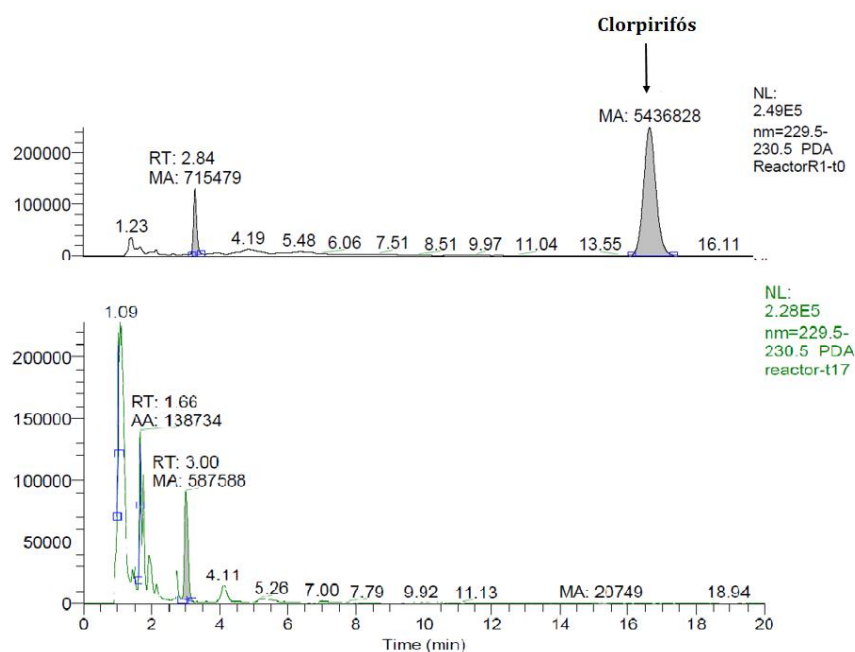


Figura 5.1. Cromatogramas obtenidos del análisis por HPLC de
a) Tiempo inicial y b) tiempo final de reacción.

Adicionalmente, fue posible determinar el porcentaje de CPP remanente en el reservorio en el transcurso de la degradación de dicho OP, alcanzándose el 100% tras 17 h de operación.

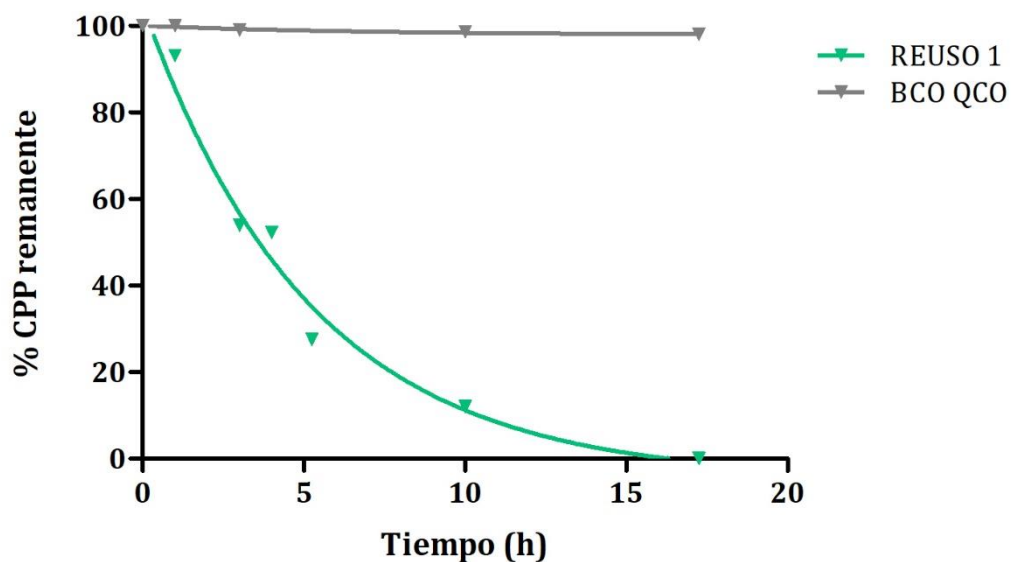


Gráfico 5.6. Cuantificación de % de degradación de CPP respecto del tiempo.

5.2.3. Caracterización del reactor

5.2.3.1. Determinación del tiempo de residencia y tipo de flujo

El diseño de un reactor, de forma simplificada, implica esencialmente la determinación del tamaño necesario para obtener una cierta cantidad de producto en condiciones precisas. Como en nuestro laboratorio se contaba con una columna de tamaño predefinido, fue de interés caracterizar el modo de operación del mismo. Para ello inicialmente se estudió el tiempo de permanencia de los elementos del fluido en el reactor, ya que, aunque el flujo total no presentara variación alguna, no todos los elementos del fluido permanecen el mismo tiempo. La distribución de los tiempos de residencia (DTR) de un reactor es una característica del mezclado que ocurre dentro de él; o sea el tiempo que tarda una molécula desde que entra hasta que sale del reactor, y está directamente ligado con el tipo de flujo del sistema^{7,8}. Este fue determinado experimentalmente mediante la técnica de “estímulo-respuesta” aplicando a la entrada del reactor una señal escalón del trazador (solución de biftalato de potasio), y evaluando su salida a través de la medición de pH.

En primera instancia, una vez llevada a cabo la experiencia y determinado el pH en función del tiempo se realizó el gráfico 6.7.a, este representa el recorrido del trazador introducido al sistema, la curva resultante es una típica curva del tipo F ($pH(t)$). Luego a partir de dichos resultados, se calculó la derivada en cada punto de la curva anterior en función del tiempo medio (Ecuación 5.1.), donde el valor máximo representa el tiempo de retención medio (Gráfico 6.7 b), siendo éste: $t_R=79,25$ min. La curva resultante (Curva “E”) es conocida como la distribución de edades a la salida (DTR).

$$Der(i) = \frac{pH(i+1) - pH(i)}{\Delta t}$$

Ecuación 5.1. Distribución de los tiempos de residencia, curva E(t).

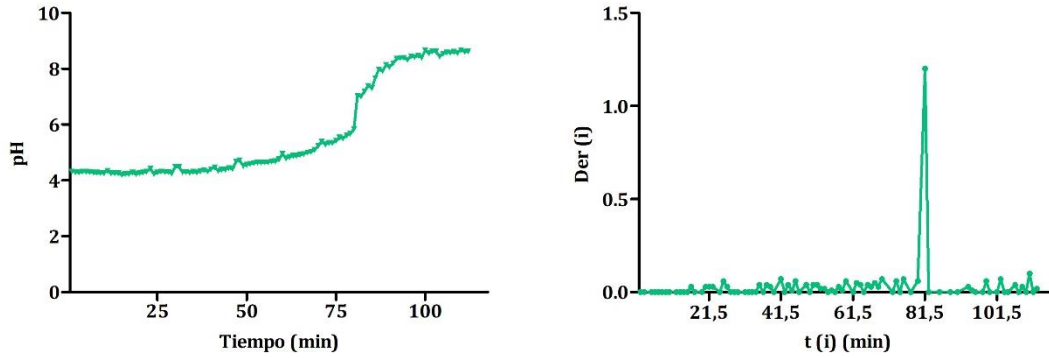


Gráfico 5.7. Variación del pH respecto del tiempo una vez iniciada la alimentación con el trazador a) Curva F b) Curva E,

A partir de la observación de dicha curva, y su comparación con las curvas de los modelos ideales para flujo pistón, sería posible determinar la existencia de un posible flujo defectuoso. Particularmente, la curva E es simétrica y sin cola larga, esto permite decir que el trazador no muestra dispersión a lo largo de su recorrido por la columna, lo que presume un flujo que se aproximaría al pistón, o sea al flujo ideal.

Si al modelo ideal de flujo se le supone un cierto grado de difusión axial, es decir retromezcla, es posible determinar el grado de dispersión de los elementos dentro del fluido a través del Modelo de Dispersión que relaciona el número de Peclet con el tiempo de residencia promedio y la varianza⁴. A partir de la curva E (t) (Gráfico 5.7. b) fue posible estimar el grado de desviación o dispersión que sufrió el escalón a través de la columna, cuantificándose mediante la varianza (σ^2) de la curva E(t) a partir de la ecuación 5.2.

$$\sigma^2 = \frac{\sum_i Der(i)t(i)^2 \Delta t}{\sum_i Der(i) \Delta t} - tR^2$$

Ecuación 5.2. Calculo para la determinación de la varianza σ^2 .

Posteriormente se calculó el número de Peclet a partir de la ecuación 5.3. y finalmente el coeficiente de dispersión axial (D_z , Ecuación 5.4).

$$\frac{\sigma^2}{tR^2} = \frac{2}{Pe + 1} \text{ válida para } \frac{\sigma^2}{tR^2} \leq 0,3$$

Ecuación 5.3. Ecuación del número de Peclet.

$$Pe = \frac{vL}{D_z}$$

Ecuación 5.4. Calculo del coeficiente de dispersión axial (D_z).

En la tabla 6.4. se observa que Dz fue un valor pequeño, cercano a cero, lo que permite concluir que el reactor tiende al flujo pistón. Por lo tanto en el reactor tubular empleado, la reacción estudiada se desarrolla a lo largo del recorrido por el espacio tubular como un pistón o émbolo, por lo que no existe mezcla en la dirección de desplazamiento, siendo los perfiles de velocidad planos.

tR	79,25 min
σ^2	144,79
Pe	85,761
Dz	0,004

Tabla 5.4.

5.2.3.2. Reutilización y productividad

Aunque el empleo de biocatalizadores inmovilizados es una estrategia muy utilizada, con el proceso de inmovilización puede haber pérdidas de actividad. Sin embargo, ésta puede ser compensada con la posibilidad de la reutilización del mismo, lo que influye directamente en el costo y la productividad del proceso.

Se estudió la reutilización de los biocatalizadores en el biorreactor tanto para la degradación de PO como de CPP. Para ello entre los ciclos de degradación, se llevó a cabo un lavado con 2 volúmenes de columna, y posteriormente se dio inicio al siguiente ciclo de reacción. En el primer ciclo de degradación se determinó un consumo total de PO tras 56 h de reacción, mientras que para CPP el consumo del 100% se alcanzó tras 15 h. En relación a ello, se determinó para los sucesivos reusos la actividad alcanzada a dichos tiempos (gráfico 5.8.).

Se considera que un biocatalizador puede ser reutilizado tantas veces en tanto mantenga al menos el 50% de actividad respecto del primer ciclo. Es por ello, que el biocatalizador para el tratamiento de PO, es posible reutilizarlo al menos 3 veces. Mientras que cuando se evaluó la degradación de CPP, tras 8 ciclos de reacción este mantiene un 60% de actividad, con lo cual podría continuar utilizándose. Por consiguiente, el reactor para el tratamiento de aguas contaminadas con CPP, sería más productivo. Ya que soporta más ciclos de reacción y estos ciclos son más cortos.

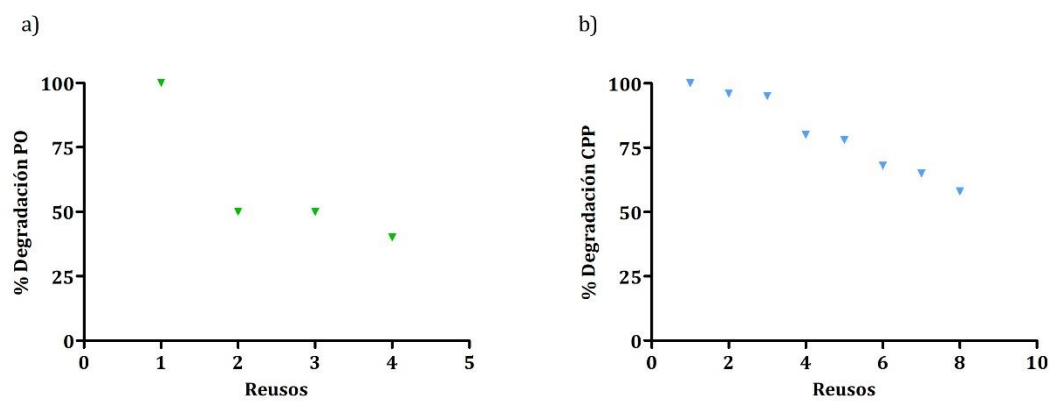


Gráfico 5.8. Reusos. Actividad remanente respecto del primer ciclo de degradación de: a) PO, b) CPP,

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

En los últimos años, la biotecnología ha experimentado grandes avances y, por ende también sus aplicaciones industriales. Entre ellas, los procesos catalizados por enzimas utilizados en la industria son cada día más numerosos, ya que presentan importantes ventajas frente a los catalizadores convencionales no biológicos.

Debido a que la mayoría de las enzimas son solubles en agua, su separación de los sustratos y productos no es sencilla, y por lo tanto no pueden ser reutilizadas. Sin embargo, su inmovilización ha permitido superar estos últimos inconvenientes, logrando que el proceso biotecnológico sea económicamente rentable.

Con miras a aplicar los resultados obtenidos en este trabajo con los biocatalizadores analizados a la biorremediación de aguas contaminadas con OPs, en este trabajo se inmovilizaron por atrapamiento en alginato de calcio tanto células enteras como extractos enzimáticos provenientes de los microorganismos bacterianos descriptos.

En líneas generales, no se observaron diferencias significativas en los porcentajes de degradación al trabajar con extracto enzimático inmovilizado respecto de las células enteras inmovilizadas. Por lo que, tras el análisis de los resultados obtenidos se decidió inmovilizar las células enteras de C49 y Pd para ser utilizadas como biocatalizador en la degradación de PO y CPP respectivamente, en el sistema de reactor tubular de lecho empacado.

Los biocatalizadores seleccionados fueron caracterizados en cuanto a su reutilización observándose que en la degradación de PO, el biocatalizador se pudo reutilizar hasta 3 veces, mientras que el de CPP tras 8 ciclos de reusos no alcanzó un decaimiento del 50% de su actividad, por lo que se podría seguir utilizando. Asimismo se han estudiado las limitaciones de transferencia de masa determinándose que en el caso del biocatalizador empleado para la degradación de CPP no existen problemas difusionales. Mientras que C49 inmovilizada si presentó estas limitaciones, que podrían determinarse diseñando un modelado matemático que se ajuste al comportamiento enzimático de los biocatalizadores empleados, para la determinación de la velocidad observable de reacción. Experimentalmente podrían evaluarse el efecto sobre la transferencia de masa del tamaño de poro o entramado del soporte, como así también del tamaño de las perlas de alginato.

Por otra parte, se estudió la distribución de los tiempos de residencia, o sea permanencia de los elementos del fluido dentro del reactor, determinándose que su

comportamiento de flujo era del tipo pistón por lo que el recorrido del fluido en el espacio tubular es como un émbolo, siendo la dispersión axial del fluido despreciable.

El reactor diseñado en este trabajo degrada 0,15 mM de CPP en 56 h, en comparación con trabajos previamente reportados los rendimientos son inferiores^{9,10}, pero es importante no perder de vista que el biocatalizador empleado es *wild type*, y que es posible reutilizarlo un número mayor de ciclos que otros sistemas ya estudiados¹¹. En suma, los resultados obtenidos son alentadores para explorar en un trabajo futuro el escalado del biorreactor diseñado.

Finalmente, si bien se ha evaluado la degradación de PO por ser uno de los OPs más estudiados, el reactor para el tratamiento de aguas contaminadas con CPP, cobra mayor relevancia por ser este pesticida uno de los más utilizados en nuestro país en la producción agroindustrial como insecticida. También, es importante resaltar que este OP es utilizado en el tratamiento de pulgas y garrapatas. Debido a sus usos, este pesticida se distribuye y dispersa en el ambiente por aplicaciones terrestres y aéreas; por lo que existe como residuos en los alimentos y en el agua, contaminando vegetales, peces, aves y demás animales. Es por ello que el sistema diseñado se presenta como una posible solución a esta problemática que afecta directamente a mamíferos considerando la alta toxicidad de estos compuestos. Asimismo, los biocatalizadores hallados podrían ser aplicados a otros tipos de reactores a fin de explotar su capacidad en la degradación de CPP a temperaturas elevadas.

BIBLIOGRAFÍA

1. Ficha técnica empresa Nufarm, InsuAgro. 2018
 2. Chishti Z, Hussain S, Arshad KR, Khalid A, Arshad M. Microbial degradation of chlorpyrifos in liquid media and soil. *J Environ Manag* 2013; **114**: 372-380.
 3. Doran PM. Principios de ingeniería de bioprocesos. *Editorial Acribia SA* 1998.
 4. Smidsrod O and Skjåk-Braek G. Alginate as immobilization matrix for cells. *TIBTECH* 1990; **8**: 71-77
 5. García-Mancha N, Monsalvo V M, Puyol D, Rodriguez JJ, Mohedano AF. Enhanced anaerobic degradability of highly polluted pesticides-bearing wastewater under thermophilic conditions. *J Hazard Mater* 2017; **339**: 320–329.
 6. Manco G, Porzio E, Suzumoto Y. Enzymatic detoxification: a sustainable means of degrading toxic organophosphate pesticides and chemical warfare nerve agents. *J Chem Technol Biotech* 2018; **93(8)**: 2064–2082.
 7. Rodríguez Chaparro T, Pinzón LH, Arámbula CA. Estudio de distribución de tiempos de residencia en un reactor biológico de lecho empacado cerámico. *Ciencia e Ingeniería Neogranadina* 2004; **14**: 1-11.
 8. Bahl CD, Gely MC, Pagano AM. Patrones de flujo en reactores químicos: Desarrollo de modelos matemáticos y numéricos basados en CFD. *Mecánica Computacional* 2012; **31**:49-68.
 9. Yadav M, Srivastva N, Singh RS, Upadhyay SN, Dubey SK. Biodegradation of chlorpyrifos by *Pseudomonas sp.* in a continuous packed bed bioreactor. *Bioresour Technol* 2014; **165**: 265–269.
 10. Yadav M, Srivastva N, Shukla AK, et al. Efficacy of *Aspergillus sp.* for degradation of chlorpyrifos in batch and continuous aerated packed bed bioreactors. *Appl Biochem Biotechnol* 2014; **175**: 16–24.
- Khalid S, Han J, Hashmi I, Hasnain G, Ahmed MA, Khan SJ, Arshad M. Strengthening calcium alginate microspheres using polysulfone and its performance evaluation: Preparation, characterization and application for enhanced biodegradation of chlorpyrifos *Sci*

CAPÍTULO 6

“Hongos, fuentes de hidrolasas degradadoras de MPO”

OBJETIVOS

- **Objetivo General**

Hallar nuevas fuentes de hidrolasas extracelulares capaces de degradar OPs.

- **Objetivos específicos**

12. Realizar un screening de actividad fosfotriesterasa a partir de microorganismos fúngicos en medio líquido.

13. Determinar la actividad OP hidrolasa extracelular de los hongos seleccionados en 1.

14. Obtener extractos enzimáticos concentrados, parcialmente purificados y activos a partir de los hongos seleccionados en 1.

15. Evaluar la capacidad hidrolítica de los extractos obtenidos en 3 a pH 8.

16. Obtener y evaluar la actividad del extracto enzimático liofilizado.

17. Optimizar la cantidad de extracto enzimático liofilizado en la mezcla de reacción.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.3. SCREENING EN MEDIO LÍQUIDO DE PTE FÚNGICAS

5.3.1. *Evaluación de la actividad PTE fúngica*

A diferencia de bacterias existe poca información sobre la biodegradación de OPs por hongos. Si se considera que éstos son miembros importantes de los microorganismos que son críticos para el ciclo biogeoquímico y son responsables de la degradación de algunos xenobióticos en la biosfera, es que resulta de interés evaluar su capacidad en la biodegradación de OPs. En este sentido y con la finalidad de llevar a cabo un *screening* de actividad PTE fúngica, se seleccionaron en base a bibliografía y a los hongos disponibles en nuestro laboratorio, cuatro microorganismos a ser evaluados como biocatalizadores en la degradación de MPO: *Fusarium sp* (FSP), *Penicillium chrysogenum* (PENCH), *Penicillium nalgiovence* (PENNL) y *Aspergillus niger* (ASN). Este último ya ha sido reportado con actividad PTE en la degradación de CPP y endosulfan¹ mientras que en este trabajo se lo evaluará frente a un OP aún no reportado.



Figura 6.1. Microorganismos evaluados en la degradación de pesticidas.

Para la reacción de biodegradación en medio líquido, a partir de los cultivos en placa de las cepas seleccionadas se colectaron 1×10^5 esporas mL^{-1} , y se cultivaron en presencia de MPO para inducir la producción de PTE u otras clases de enzimas capaces de degradar dicho OP. Como las enzimas necesarias para la catálisis de la biodegradación de MPO pueden no ser inherentes al metabolismo fúngico, el crecimiento de las cepas en presencia de OP puede inducir la formación de estas enzimas durante el proceso. Adicionalmente, a lo largo de este trabajo se ha remarcado la importancia en la actividad PTE frente a ciertas variables como el pH, la temperatura y del sustrato. Considerando que no hemos hallado reportes del uso de hongos como biocatalizadores en la degradación de MPO, este fue seleccionado como sustrato. Por su parte el pH también fue un parámetro que se tuvo en cuenta. Es por ello que, tras el crecimiento de los hongos, a cada uno de los cultivos se les determinó el pH, observándose que los medios de reacción de ASN y PENNL tenían pH2, mientras que FSP y PENCH, pH5. Si bien se ha reportado y sugerido a lo largo de este trabajo que en su mayoría las PTEs exhiben actividades catalíticas mejoradas principalmente a pHs básicos^{2,3}, se han hallado algunas PTEs bacterianas con actividad hacia pHs ácidos, por lo que se decidió continuar trabajando bajo las condiciones nativas del cultivo fúngico. Para ello, los cultivos crecidos fueron inoculados con 2mM de MPO dando inicio a la reacción. Ésta se llevó cabo a 30°C, y el seguimiento de la biodegradación se realizó analizando la formación de PNF a distintos tiempos, Edwards y Tchounwou⁴ informaron que la vida media de MPO en medios acuáticos (lago, río, agua marina y agua destilada) oscilaba entre 24 y 30 días. Por lo tanto, se llevaron a cabo experimentos hasta los 30 días para que la degradación progrese en el período de vida media reportado ya que el principal objetivo es utilizar estos microorganismos en el tratamiento de aguas contaminadas con OPs.

En todos los casos cuando se llevó a cabo la reacción de hidrólisis con el cultivo completo (*Growing, Grw*), se comprobó y determinó la degradación del 92% de MPO cuando se utilizó PENCH como biocatalizador, un 65% aproximadamente con ASN y PENNL, y un 51% con FSP (Tabla 6.1). Además, con el objetivo de comprobar la actividad PTE extracelular, a partir de los cultivos fúngicos se obtuvieron los respectivos crudos enzimáticos (CE) de cada hongo. Para ello, los cultivos fúngicos fueron centrifugados y filtrados con filtros de 0,22 μm , y los filtrados resultantes fueron utilizados como medio de reacción siguiendo la premisa de que la enzima capaz de degradar MPO era extracelular. Tal como se observa en el gráfico 6.1. en todos los casos se comprobó actividad PTE extracelular. Posteriormente, a partir de los resultados reportados en dicho gráfico, se determinaron las V_{0s} (Tabla 6.1.), no se observaron diferencias significativas cuando se

empleó el medio de reacción completo respecto de CE, a excepción de ASN donde la disminución de la actividad es mínima. Estos resultados indican que la enzima capaz de degradar OP es extracelular, permitiendo alcanzar porcentajes de degradación de 99% y 65,5% empleando el extracto enzimático de PENCH y FSP respectivamente en 30 días de reacción.

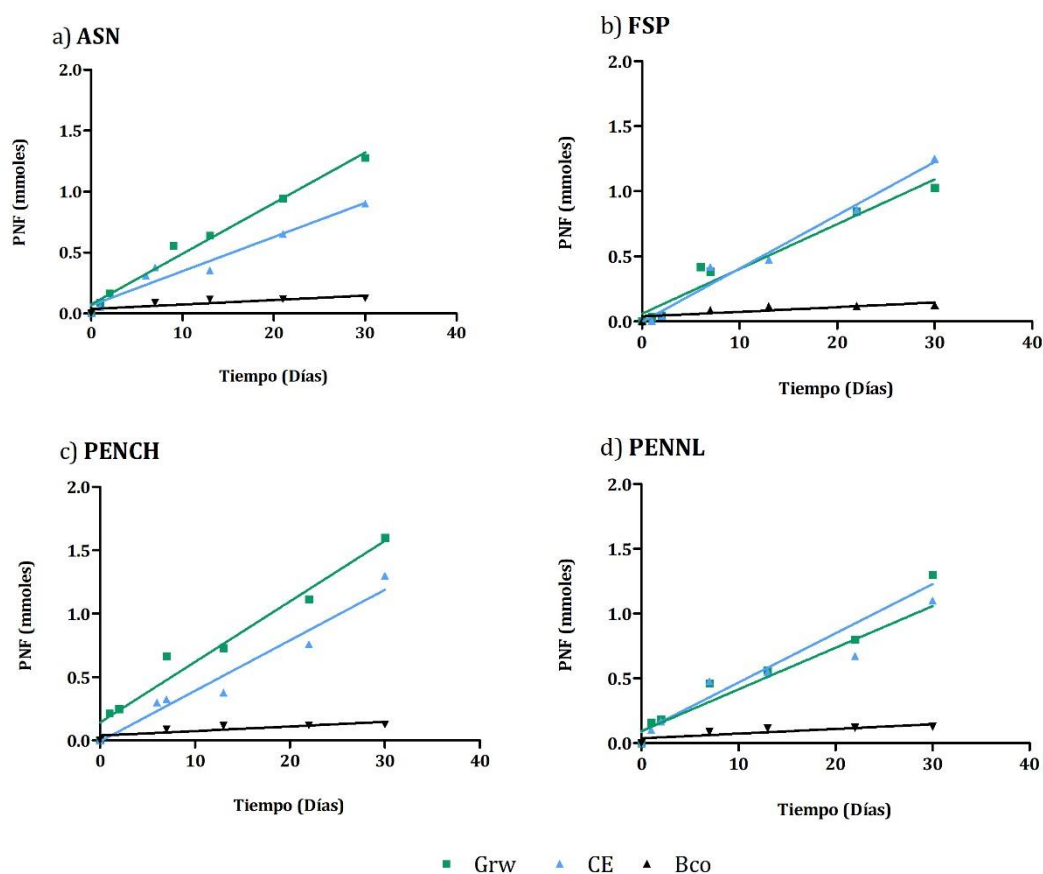


Gráfico 6.1. Cinética enzimática en medio líquido empleando cultivo fúngico (Growing, Grw) y el crudo enzimático (CE).

Hongo	% Consumo		Vo ($\mu\text{mol}/\text{min}$)	
	Grw	CE	Grw	CE
ASN	63,9	32,6	$0,029 \pm 0,002^{**}$	$0,020 \pm 0,004$
FSP	51,4	62,5	$0,024 \pm 0,003$	$0,029 \pm 0,002$
PENCH	92,3	99,0	$0,038 \pm 0,003$	$0,034 \pm 0,003$
PENNL	65,1	55,3	$0,027 \pm 0,002$	$0,022 \pm 0,003$

Tabla 6.1. Porcentajes de degradación de MPO y Vo determinados empleando diferentes biocatalizadores.

Estudios previamente reportados en la degradación de MP, empleando células enteras de *Aspergillus sydowii* y *Penicillium decaturense* en *growing* exhibieron que tras 20 días de reacción a pH 7 y 30°C, se alcanzó entre un 96% y 100% de biodegradación del OP⁵. Por su parte Jain et al⁶ obtuvieron a partir de hongos aislados (*Aspergillus niger*, *Aspergillus flavus*, *Penicillium aculeatum* y *Fusarium pallidoroseum*) sus respectivas PTE extracelulares alcanzando hasta un 96% de degradación de monocrotofós al utilizarlas como biocatalizadores a pH 8, 32°C por 4 días. Aunque los resultados conseguidos al utilizar los biocatalizadores propuestos en el presente trabajo arrojaron porcentajes de degradación destacables como en el caso de FSP y PENCH, los tiempos en que se obtuvieron fueron más prolongados respecto de lo reportado en bibliografía. En este punto es interesante mencionar que los ensayos realizados en este trabajo fueron llevados a cabo a pHs ácidos, reportándose entonces cuatro nuevos hongos que secretarían una hidrolasa capaz de degradar MPO a pH 2 y 5. La capacidad de estas enzimas fúngicas sería aplicable al tratamiento de frutas y vegetales⁷ que contienen pesticidas OP en la superficie o en sus hojas producto del rociado con pesticida durante su cultivo, tales como *L. brevis*⁸ o *S.phaeochromogenes* (C35) propuesta en este trabajo.

6.2.1. Efecto del pH en la actividad PTE fúngica

Con el objetivo de optimizar las condiciones de reacción, nos hemos propuesto estudiar el efecto del pH en la actividad enzimática de los cuatro biocatalizadores fúngicos.

En el gráfico 6.2. se observan tanto los valores de V_0 como así también los porcentajes de degradación obtenidos al realizar el ensayo cinético empleando como fuente de biocatalizador el medio de cultivo, Grw, y el crudo enzimático, CE. Tal como era esperado conforme varía la V_0 , también lo hacían los porcentajes de degradación. Sólo en el caso de FSP se observó un incremento significativo a pH8 en la actividad hidrolítica respecto del pH original, alcanzando en forma Grw un 89% de degradación. Por su parte PENNL y PENCH exhibieron un pequeño incremento, mientras que ASN disminuyó su actividad.

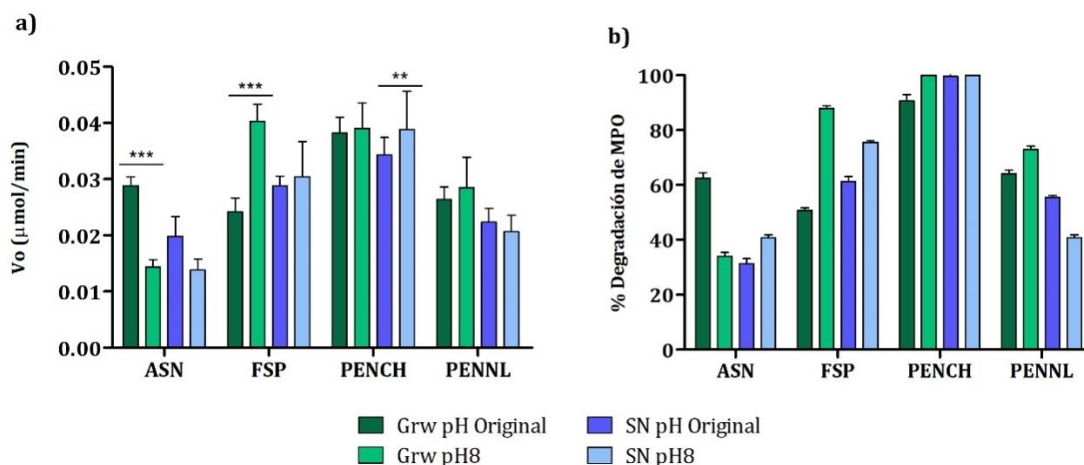


Gráfico 5.2.a) Velocidad inicial de reacción y **b)** porcentaje de degradación de MPO, para ambos Grw y CE de cada hongo al pH original vs pH8.

Tras evaluar los hongos como fuentes de enzimas capaces de degradar MPO a pH ácido y básico, estos biocatalizadores demostraron ser versátiles y capaces de hidrolizar dicho OP en dos zonas de pH antagónicas, esto abre un abanico mayor de posibles usos de estos microorganismos, ya no solo en el tratamiento de alimentos como se mencionó anteriormente sino, en suelos y ambientes de diferentes rangos de pH contaminados con este tipo de compuestos^{1, 9}.

5.4. OBTENCIÓN Y OPTIMIZACIÓN DE UN EXTRACTO ENZIMÁTICO FÚNGICO ACTIVO

A partir de un cultivo de un microorganismo se puede obtener la enzima deseada por los métodos tradicionales de purificación de proteínas. En general requiere de tres grandes pasos: el cultivo del microorganismo productor de la enzima de interés, la recuperación y purificación de la enzima, y la formulación del producto enzimático en polvo, granulados o disoluciones¹⁰.

En este trabajo se propuso la obtención de un extracto enzimático parcialmente purificado de las OP hidrolasas fúngicas extracelulares, considerando que trabajar con enzimas extracelulares confiere ciertas ventajas por ser la purificación de estas mucho más fácil que el aislamiento de enzimas intracelulares ya que no se requieren métodos de lisis o ruptura celular.

5.4.1. *Obtención de extracto enzimático fúngico*

La degradación de OPs empleando extractos enzimáticos ha sido investigada^{11, 12}. Por ejemplo Ya et al¹³ han evaluado la degradación de CPP por “*Extractos libres de células (CFE)*” de *Verticillium* en vegetales en condiciones de laboratorio y agrícolas. Trabajar con CFE o enzimas extracelulares purificadas permite una mejor manipulación del biocatalizador. Particularmente los hongos involucran mayores tiempos de crecimiento a diferencia de las bacterias: la preparación de los cultivos en medio sólido y luego líquidos abarcan al menos entre 10 y 14 días de crecimiento microbiano, dependiendo del hongo. Asimismo la cantidad de enzima por mL de cultivo que expresa suele ser menor que en bacterias. Considerando este último punto y pensando en un proceso más rentable, nos propusimos obtener un extracto enzimático fúngico. A partir de un cultivo fúngico de 400 mL de cada hongo, obtenidos según descrito en la sección 6.1.1., se llevó a cabo una centrifugación y filtración, el filtrado resultante fue utilizado como fuente de hidrolasas (CE). Posteriormente se evaluaron dos protocolos para ser concentrados, y semi-purificados:

5.4.1.1. *Concentración por precipitación*

A partir de los crudos enzimáticos se precipitaron enzimas con sulfato de amonio al 80%. El precipitado se recogió por centrifugación y se disolvió en el menor volumen posible de buffer Tris-HCl 50 mM (pH 8). Luego, se dializó contra el mismo buffer a fin de desalar el CE. En este punto se tuvieron inconvenientes, ya que luego del proceso de diálisis se observaba un precipitado.

Tras evaluar la posibilidad de trabajar con diferentes concentraciones de sulfato de amonio, nos encontrábamos en un compromiso considerando que quizás la enzima de interés no precipitaría. Es por ello que evaluamos un nuevo protocolo evitando agregar sales al medio.

5.4.1.2. *Concentración y purificación parcial por filtración*

Nuevamente, partiendo de 400 mL de los respectivos CE se consiguió concentrar 50 veces los extractos enzimáticos (EE) de PENCH y PENNL, y 40 veces los provenientes de ASN y FSP. Los EE resultantes no solo fueron concentrados mediante centrifugación, sino que también es posible afirmar que se realizó una purificación parcial considerando que los centricones utilizados poseen una membrana con un *cut off* de 10 kDa, y por

consiguiente separan por tamaño molecular las enzimas. Basándonos en que en general las PTE suelen tener un tamaño total aproximado de 73 kDa⁵ tras llevar a cabo la ultracentrifugación seleccionamos y conservamos la fracción correspondiente al tamaño de interés.

Tras la obtención de los EE concentrados, la actividad enzimática y los porcentajes de degradación fueron determinados (Gráfico 6.3.) si bien se observan leves disminuciones en la V_o exhibida cuando se compara lo obtenido para EE concentrado respecto del CE, estas diferencias no son significativas, lo que indicaría que el proceso de concentración y semi-purificación no afectaron a la capacidad catalítica. Pero bien, esas pequeñas disminuciones en la actividad observada se pueden ligar al procedimiento experimental, pudiendo haberse perdido una cierta masa de la enzima de interés producto de la manipulación de la misma.

En una tercera etapa, se llevó a cabo el proceso de liofilización de los extractos enzimáticos concentrados a fin de obtener un biocatalizador estable, fácil de manipular y conservar. En general, las enzimas suelen ser más estables desecadas que en disolución, por lo que se recurre a este proceso o a la preparación de granulados⁹. Los EEs concentrados obtenidos fueron liofilizados y evaluada su actividad enzimática, observándose una ligera disminución tanto en la actividad hidrolítica y por ende en los porcentajes de degradación de MPO respecto de lo exhibido cuando se utilizó como fuente de PTE el EE concentrado, sin embargo estas disminuciones no son significativas (Gráfico 6.3.), a excepción de lo observado para el EE liofilizado de PENCH, el cual es capaz de degradar un 20% menos a MPO. Es probable que la OP hidrolasa de PENCH sea más sensible a la eliminación completa de agua del medio por lo que el proceso de liofilización produzco la desnaturalización enzimática al modificar el microentorno enzimático.

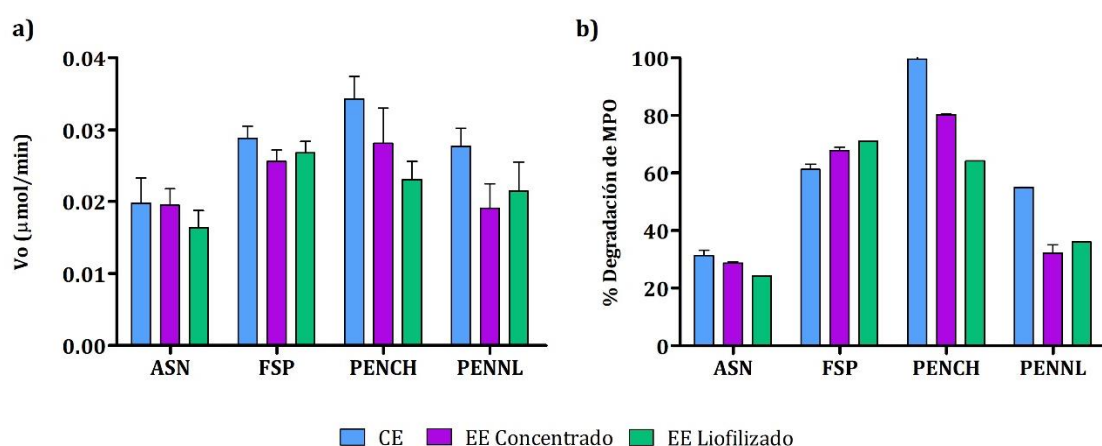


Gráfico 6.3.a) Velocidad inicial de reacción y b) % degradación de MPO, cuando el crudo enzimático (CE), extracto enzimático concentrado y extracto enzimático liofilizado fueron utilizados como biocatalizadores.

Finalmente y a modo de resumen, en la tabla 6.2. se detallan tanto la cantidad de proteínas totales como su actividad enzimática, para los biocatalizadores obtenidos en cada una de las etapas previamente mencionadas.

		Masa seca del micelio fúngico (g)	Proteínas totales (mg mL⁻¹)	Actividad enzimática (μmol min⁻¹)	Cantidad total
Crudo	ASN			0,020 ± 0,004	
	FSP	5,31	ND	0,029 ± 0,002	400 mL
	PENCH	16,98		0,034 ± 0,003	
	PENNL			0,027 ± 0,003	
Concentrado y semi purificado	ASN	-	0,69	0,020 ± 0,002	10 mL
	FSP	-	0,66	0,026 ± 0,002	10 mL
	PENCH	-	0,1	0,028 ± 0,005	8 mL
	PENNL	-	0,35	0,019 ± 0,003	8 mL
Liofilizado	ASN	-	0,62	0,016 ± 0,002	187 mg
	FSP	-	0,60	0,027 ± 0,002	124,4 mg
	PENCH	-	0,95	0,023 ± 0,003	139,6 mg
	PENNL	-	0,33	0,022 ± 0,004	163,4 mg

Tabla 6.2. Perfil de cada etapa de obtención del extracto enzimático semi-purificado de hidrolasa capaces de degradar MPO.

5.4.2. Optimización de la carga enzimática

Una vez obtenido el EE liofilizado y constatado que tras dicho proceso mantiene su actividad enzimática, fue de interés optimizar la cantidad de biocatalizador a fin de mejorar los porcentajes de degradación y los tiempos de la misma. Al llevar a cabo la hidrólisis enzimática con el agregado de 10 veces más la cantidad de biocatalizador (10X) respecto de lo empleado en los ensayos de la sección 5.1, se observó que la V_o del EE liofilizado de PENCH incrementó su actividad un 50%, mientras que los de ASN y PENNL exhibieron aproximadamente el doble de la actividad enzimática respecto de lo reportado para las mismas reacciones con 1X (Gráfico 6.4.).

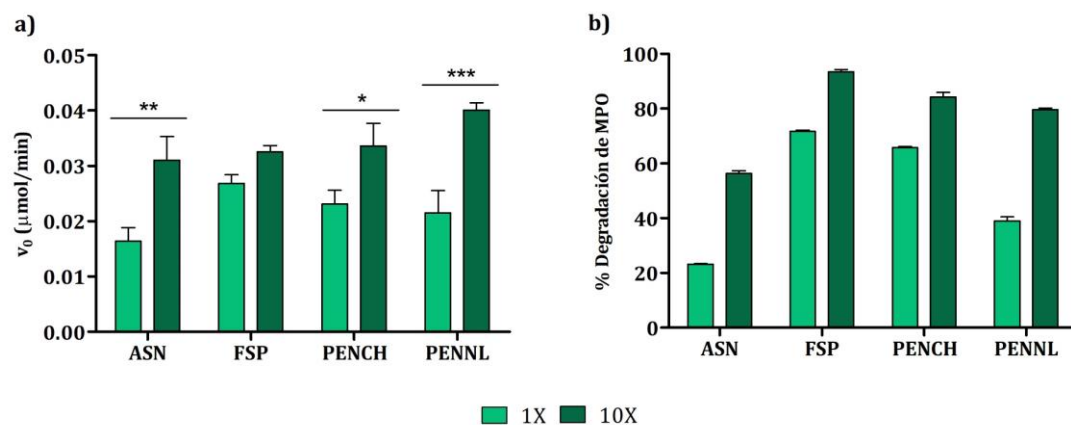


Gráfico 6.4.a) Velocidad inicial de reacción y **b)** % degradación de MPO, cuando se utilizó 1X y 10X de extracto enzimático liofilizado.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Cuatro hongos fueron evaluados como fuentes de hidrolasas, demostrando ser todos capaces de degradar MPO en medio líquido. *Penicillium chrysogenum* fue el que exhibió mayor actividad hidrolítica degradando el 92% del OP, mientras que *Aspergillus niger* y *Penicillium nalgiovense* presentaron porcentajes de degradación del 65%, y *Fusarium sp* de 51% tras 30 días. Es interesante destacar que estos microorganismos exhibieron dichos porcentajes de degradación a pHs ácidos, ya que como se mencionó anteriormente, la mayoría de las PTEs reportadas son más activas a pH básicos (pH 7-9). Además, la actividad OP hidrolasa de estos hongos no había sido previamente reportada.

Se comprobó que las hidrolasas involucradas en la degradación de MPO de estos hongos eran extracelulares manteniendo su actividad cuando se evaluó el crudo enzimático. Si bien no se han realizados estudios a nivel molecular a fin de confirmar qué tipo de hidrolasas presentan dichos hongos, Jain & Gaarn¹⁰ han reportado y determinado que algunas cepas de *A. niger*, *A. flavus*, *P. aculeatum* y *F. pallidorozeum* presentan hidrolasas extracelulares que están compuestas por dos subunidades de 33 y 67 kDa coincidentes con las PTE bacterianas. Adicionalmente, se obtuvo como biocatalizador un extracto enzimático liofilizado, que a excepción del extracto de PENCH que mostró 40% menos actividad PTE, el resto mantuvieron su capacidad catalítica respecto de lo obtenido al inicio del proceso. En consecuencia, en líneas generales es posible afirmar que con los resultados obtenidos fue posible obtener un biocatalizador estable, fácilmente manipulable y conservable.

Actualmente existen reportes del uso de extractos libres de células fúngicas aplicados al tratamiento de CPP en vegetales como la espinaca de agua (*Ipomoea aquatica-water spinach*), espinaca china (*Basella alba-Malabar spinach*) y pimiento, entre otros⁹ y considerando que los biocatalizadores aquí estudiados son altamente activos a pHs ácidos, estos serían potenciales biocatalizadores para el tratamiento de alimentos contaminados con estos pesticidas. Respecto al tratamiento de aguas contaminadas con OPs estos biocatalizadores también serían de utilidad ya que mostraron ser también activos a pH básico^{1,8}.

En perspectivas a futuro sería útil evaluar el extracto enzimático frente a diferentes OPs, a fin de determinar la especificidad por sustrato, que como bien ya hemos demostrado puede ser sumamente variable de acuerdo a su estructura química.

BIBLIOGRAFÍA

1. Supreeth M & Raju NS. Biotransformation of chlorpyrifos and endosulfan by bacteria and fungi. *Appl Microbiol Biotechnol* 2017; **101(15)**:5961-597.
2. Eivazi F & Tabatabai MA. Phosphatases in soils. *Soil Biol Biochem* 1977; **9**: 167-172.
3. Margesin R, Schinner F. Phosphomonoesterase, phosphodiesterase, phosphotriesterase, and inorganic pyrophosphatase activities in forest soils in an alpine area: effect of pH on enzyme activity and extractability. *Biol Fertil Soils* 1994; **18**:320-326.
4. Edwards FL & Tchounwou PB. Environmental toxicology and health effects associated with methyl parathion exposure a scientific review. *Int J Environ Res Public Health* 2005; **2**:430-41.
5. Alvarenga N, Birolli W, Selegim M, Porto A. Biodegradation of methyl parathion by whole cells of marine-derived fungi *Aspergillus sydowii* and *Penicillium decaturense*. *Chemosphere* 2014; **117**:47–52.
6. Jain R, Garg V. Enzymatic Degradation of Monocrotophos by Extracellular Fungal OP Hydrolases. *Appl Biochem Biotechnol* 2013; **171**:1473–1486
7. Akram S, Mushtaq M Techniques to detect and detoxify organophosphorus pesticides from fruit juices. *Fruit Juices* 2018; Chapter 19 DOI: <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802230-6.00019-9>
8. Islam SM, Math RK, Cho KM *et al.* Organophosphorus Hydrolase (OpdB) of *Lactobacillus brevis* WCP902 from Kimchi is able to degrade organophosphorus pesticides. *J Agr Food Chem* 2010; **58**:5380–6.
9. Kumar S, Kaushik G, Dar MA, Nimesh S, Lopez-Chuken UJ, Villareal-Chiu JF. Microbial Degradation of Organophosphate Pesticides: A Review. *Pedosphere* 2018; **28(2)**:190–208.
10. Castillo Rodríguez F. (2005) *Biotecnología ambiental*. Madrid, España. Ed Tébar.
11. Brown KA. Phosphotriesterases of *Flavobacterium* sp. *Soil Biol Biochem* 1980; **12**: 105–112.
12. Singh BK, Walker A, Morgan JA & Wright DJ. Biodegradation of chlorpyrifos by enterobacter strain B-14 and its use in bioremediation of contaminated soils. *Appl Environ Microbiol* 2004; **70**: 4855–4863..

13. Yun LY, Hua F, Xiao W, Xiao MW, Min S & Jing QY. Characterization of a fungal strain capable of degrading chlorpyrifos and its use in detoxification of the insecticide on vegetables. *Biodegradation* 2006; **17**: 487–494.

CAPÍTULO 7

*“Síntesis de dimetilfosfato de inosina
biocatalizada por fosfotriesterasas”*

OBJETIVOS

- **Objetivo General**

Emplear fosfotriesterasas como biocatalizadores en medio orgánico para realizar la transesterificación de fosfotriésteres con nucleósidos como nucleófilos, y de esta manera diseñar una metodología que permita la síntesis de pronucleótidos.

- **Objetivos específicos**

18. Evaluar condiciones de reacción de transesterificación previamente puestas a punto en la obtención de 5'-dimetil fosfato de inosina empleando fosfotriesterasa de *Brevundimonas diminuta*.
19. En base a la evaluación de los microorganismos *wt* hallados de nuestro cepario con la actividad hidrolítica de MPO, y la optimización de las condiciones de temperatura; evaluar C35 a 50°C como biocatalizador para la síntesis de 5'-dimetil fosfato de inosina.
20. Evaluar la capacidad de las fosfotriesterasas extracelulares fúngicas en la reacción de transesterificación.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1. SÍNTESIS ENZIMÁTICA DE 5-DIMETILFOSFATO DE INOSINA

Como bien ya se ha mencionado, la síntesis de fosfotriésteres de nucleósidos y análogos resulta ser una alternativa prometedora en el desarrollo de nuevos productos farmacológicamente activos con mejor biodisponibilidad¹. Para ello, resulta de suma importancia generar nuevas metodologías experimentales y enfoques quimiosintéticos que faciliten la obtención de este tipo de compuestos, siendo la biocatálisis aplicada una herramienta prometedora al respecto.

A lo largo de este trabajo se han empleado las fosfotriesterasas en la hidrólisis de un número de fosfotriésteres. La sustitución del agua² por otros nucleófilos como los nucleósidos permitiría diseñar la reacción de transesterificación catalizada por PTE para la obtención de fosfotriésteres de nucleósidos. En este sentido existe un único dato de literatura de una reacción de transesterificación empleando dicho biocatalizador en la transesterificación de paraoxón con 2-feniletanol en medio orgánico anhidro, utilizando dimetilsulfóxido como solvente³.

Con la finalidad de efectuar una primer aproximación a la síntesis de pronucleótidos a través de reacciones biocatalizadas, se utilizaron como catalizadores PTEs en la preparación de 5'-dimetilfosfato de inosina en medio orgánico.

7.1.1. Transesterificación biocatalizada por fosfotriesterasas bacterianas.

Se ha empleado un extracto enzimático de *Brevundimonas diminuta* como biocatalizador en la preparación de dimetil derivados de NMPs. Previamente en nuestro laboratorio se han evaluado diferentes nucleósidos como nucleófilos en la transesterificación de fosfotriésteres, particularmente para MPO, OP con el que se obtuvieron los mejores porcentajes de conversión. Además, se han evaluado condiciones de reacción tales como solventes, reacciones molares nucleósido/donor de fosfato y concentraciones de dichos reactivos. En base a estas variables estudiadas, las condiciones de reacción fueron puestas a punto.

En el presente trabajo se llevó a cabo la síntesis biocatalizada de dimetilfosfato de inosina (DMPIno) empleando el extracto enzimático de Bd mencionado y las condiciones de reacción estipuladas previamente: 1:10, MPO: Inosina, DMF anhidra a 40°C por 96 h (Figura 7.1.).

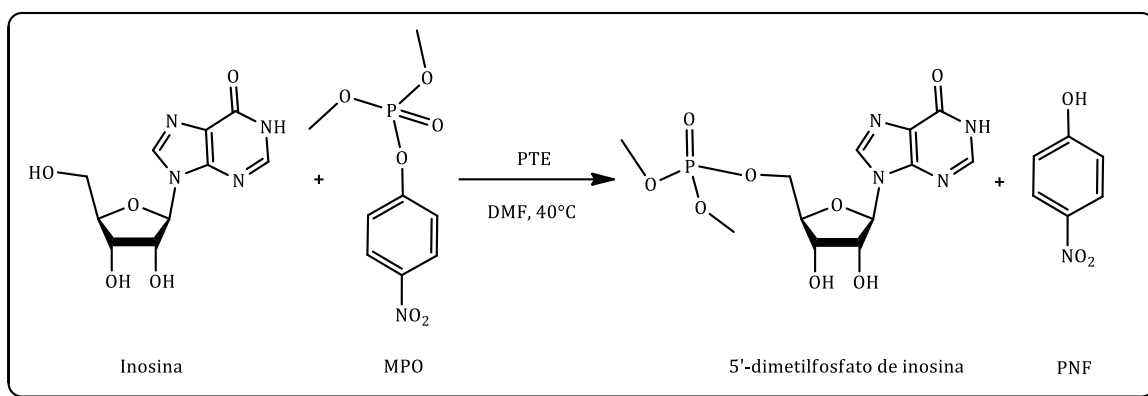


Figura 7.1. Reacción de transesterificación biocatalizada para la obtención de dimetilfosfato de inosina.

El seguimiento de la reacción se llevó a cabo analizando alícuotas por HPLC. Si se comparan los cromatogramas obtenidos al analizar la muestra del tiempo inicial respecto del final, en ambos casos se observan las señales correspondientes a los sustratos: inosina, $t_R = 4,45$ min y MPO, $t_R = 19,5$ min. Además, al final de la reacción se observan dos señales que no fueron observadas al inicio. La primera corresponde al subproducto de la reacción, PNF $t_R = 18,1$ min, mientras que la segunda señal, que no se corresponde con ninguna de las anteriormente mencionadas y posee un tiempo de retención de 7,4 min, podría adjudicarse al producto de transesterificación del triéster.

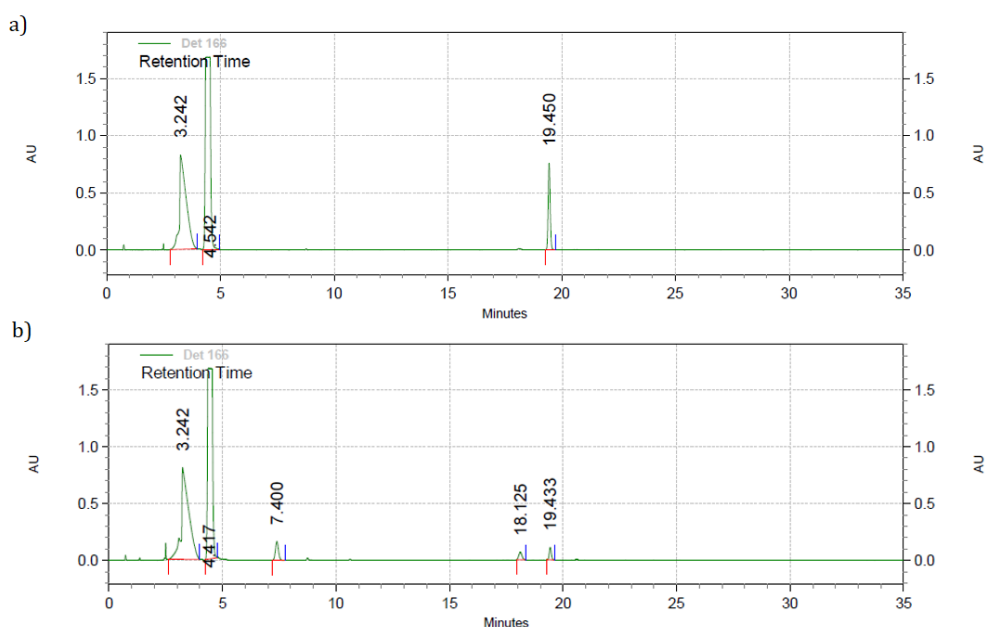


Figura 7.2. Análisis de muestras de reacción por HPLC (Dilución 1:10). a) Tiempo inicial, b) Tiempo final de reacción. Inosina, $t_R = 4,417$ min; MPO, $t_R = 19,45$ min; PNF, $t_R = 18,125$ min y DMPIno, $t_R = 7,4$ min.

Por su parte, el espectro de RMN de ^{31}P de la mezcla de reacción reveló tres señales, dos a -3,98 y -4,27 ppm, y una tercera a aproximadamente 2 ppm. Con el fin de determinar e identificar cada una de las señales, también se analizó una muestra de la reacción de hidrólisis de MPO, arrojando dos señales coincidentes con las asignadas previamente a MPO y a dimetil fosfato (DMP). Además, la señal de 2 ppm podría asignarse a un fosfotriéster en función del campo al que aparece. La concordancia entre los resultados de RMN y HPLC, sugiere que se trataría del producto de fosforilación de la inosina.

Finalmente se calculó el rendimiento respecto de la inosina mediante una curva de calibración a partir de dicho nucleósido considerando que éste es el único cromóforo capaz de absorber a 254 nm, obteniéndose 9% de DMPIno.

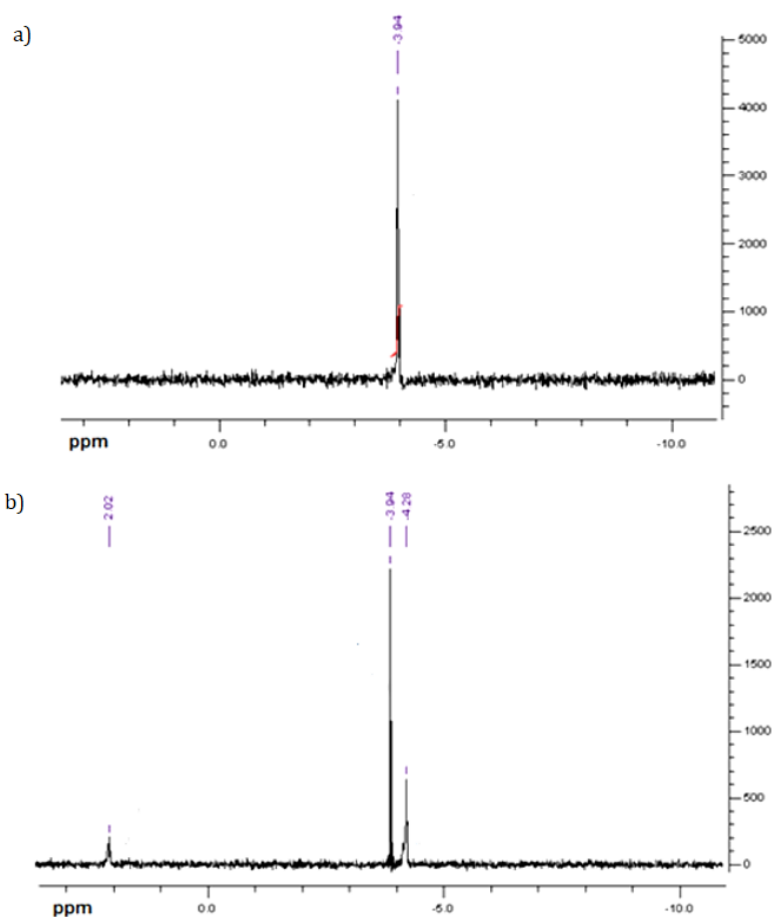


Figura 7.3. ^{31}P -RMN a) Se observa una sola señal correspondiente al MPO, b) Se observan las señales del producto DMIMP y del subproducto de hidrólisis, dimetilfosfato (DMP).

Considerando el bajo rendimiento obtenido, es que nos hemos propuesto evaluar nuevas fuentes de PTE. En este marco, cabe decir que previamente todos los microorganismos wt hallados de nuestro cepario con actividad PTE fueron ensayados

observándose rendimientos del 2% para la C35 (*S. phaeochromogenes*), mientras que para el resto de los microorganismos porcentajes inferiores o nulos. Es por ello que luego de haber estudiado y puesto a punto las condiciones de reacción de dichos microorganismos en la reacción hidrolítica, su actividad natural, se decidió evaluar la C35 a 50°C (temperatura óptima) en la reacción de transesterificación, dado que fue el biocatalizador *wt* que exhibió las mayores tasas de hidrólisis de MPO. Luego de seguir la reacción por 96 h, no se registró por HPLC una señal a los 7 min, por lo que hemos concluido que bajo dichas condiciones el rendimiento fue nulo, o quizás tan bajo que la sensibilidad del equipo empleado no permitió detectarlo.

7.1.2. Transesterificación biocatalizada por fosfotriesterasas fúngicas

Tal como se mencionó previamente, hemos hallado cuatro hongos como fuente de actividad fosfotriesterasa, por lo que fue de interés evaluar su capacidad para llevar a cabo la transesterificación y obtener DMPIno. Para ello se empleó el extracto enzimático fúngico obtenido al igual que para llevar a cabo la reacción hidrolítica. La composición de la mezcla de reacción fue la misma que la empleada en el inciso anterior. La reacción se siguió por HPLC, observándose, a excepción del extracto enzimático de ASN, una señal con un t_R de 7,5 min. Si bien en el caso de la señal correspondiente a DMPIno cuando la reacción fue llevada a cabo con PTE de Bd, arrojó un t_R de 7 min, es posible que el pequeño corrimiento se deba a que las muestras fueron analizadas en un HPLC diferente, aunque la metodología y la columna empleada fueron las mismas. Es por ello que avanzamos en el análisis por ^{31}P -RMN, observándose solamente las señales correspondientes a MPO y DMP. Esto nos lleva a concluir que las PTE fúngicas aquí estudiadas no serían buenos biocatalizadores para llevar a cabo la transesterificación.

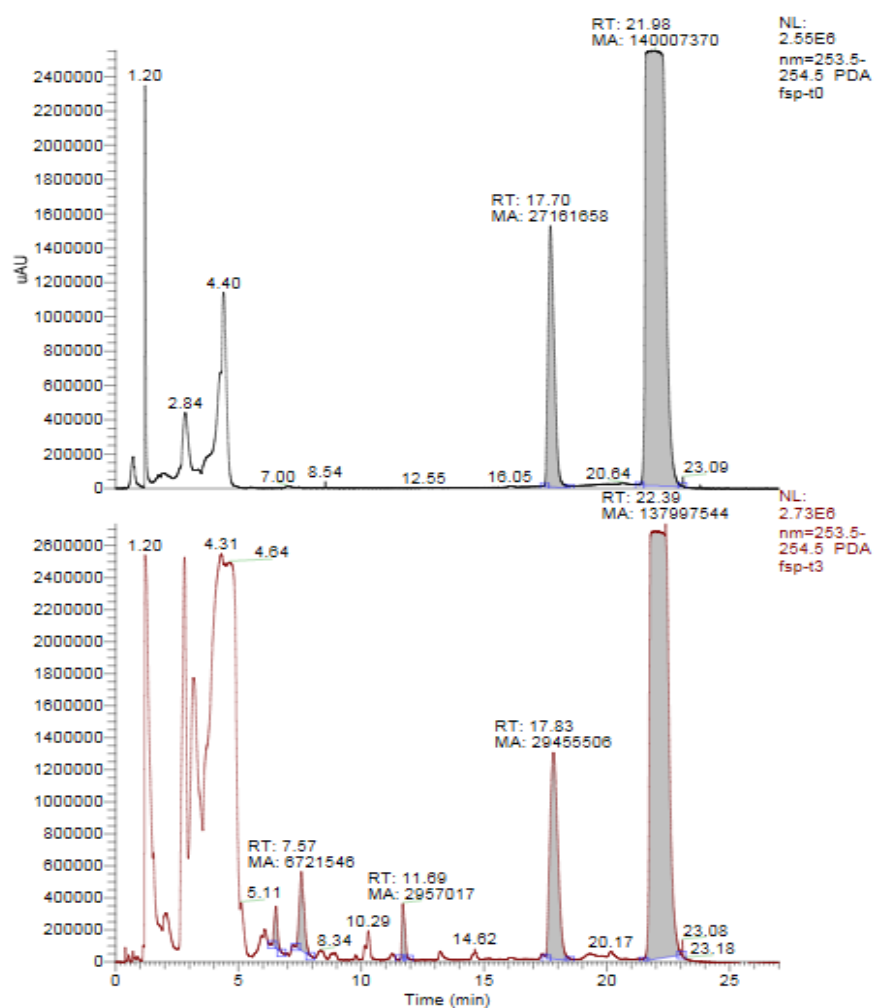


Figura 7.4. Mezcla de reacción transesterificación biocatalizada por PTE de FSP:
a) Tiempo inicial y b) tiempo final de reacción.

CONCLUSIONES

CONCLUSIONES

Los análogos de nucleósidos se han utilizado ampliamente como antivirales y medicamentos contra el cáncer, ya que imitan a los nucleósidos naturales pudiendo incorporarse en el ADN recién sintetizado causando, entre otros efectos, la terminación prematura de la cadena. Para que los análogos de nucleósidos ejerzan su acción es esencial que dichos compuestos se conviertan intracelularmente en los trifosfatos correspondientes. Sin embargo, el eficiente anabolismo de los trifosfatos es frecuentemente obstaculizado por el primer paso de fosforilación mediado por quinasas virales o celulares específicas, que da origen a los correspondiente nucleósidos monofosfatos. Con el objeto de sortear dicho paso, sería deseable poder realizar la administración directa de los monofosfatos de dichos compuestos. Sin embargo, esta estrategia presenta ciertos inconvenientes como la limitación de su transporte hacia la célula y la rápida desfosforilación. Es por ello que surge el desarrollo de prodrogas, mediante las cuales se enmascara la carga o cargas negativas del fosfato^{4, 5, 6}.

La utilización de enzimas para la preparación de prodrogas nucleotídicas se presenta como una gran alternativa. En este trabajo se han evaluado dos fosfotriesterasas bacterianas y cuatro fúngicas en la reacción de transesterificación de metil paraoxón con inosina. Se obtuvo 10% (respecto del nucleósido) de 5'-dimetilfosfato de inosina con la fosfotriesterasa de *Brevundimonas diminuta*. Es importante mencionar que los resultados obtenidos son datos preliminares que deben ser corroborados mediante una estricta elucidación estructural del producto formado.

De confirmarse nuestra hipótesis, se presentaría una metodología sencilla y novedosa para la síntesis de fosfotriésteres de nucleósidos. Además sería de interés obtener por medio de ingeniería genética, la PTE sobreexpresada a fin de mejorar los rendimientos obtenidos. También sería útil llevar a cabo mutagénesis a fin de optimizar la aceptación de sustrato.

BIBLIOGRAFÍA

1. Poijärvi-Virta P, Lönnberg H. Prodrug Approaches of Nucleotides and Oligonucleotides. *Curr Med Chem* 2006; **13**: 3441-3465.
2. Aubert SD, Li Y & Raushel FM. Mechanism for the hydrolysis of organophosphates by the bacterial phosphotriesterase. *Biochemistry* 2004; **43**: 5707-5715.
3. Sode K, Ohuchi S, Nakamura H, Narita M. A novel transesterification catalyzed by phosphotriesterase in an organic solvent. *Biotech. Lett.* 1996; **18**: 923.
4. Uchida K, Kreis W. Studies on drug resistance. I. Distribution of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine, cytidine and deoxycytidine in mice bearing ara-C-sensitive and-resistant P815 neoplasms. *Biochem Pharmacol* 1969; **18**: 1115-1128.
5. Bapat AB, Zarow C & Danenberg PV. Human leukemic cells resistant to 5-Fluoro-2'-deoxyuridine contain a thymidylate synthetase with lower affinity for nucleotides. *J Biol Chem.* 1983; **258**, 4130.
6. Posternak T. Cyclic AMP and cyclic GMP *Annu. Rev. Pharmacol.* 1974; **14**: 23-33.

CONCLUSIONES FINALES Y PERSPECTIVAS A FUTURO

En la presente tesis doctoral se han seleccionado y estudiado nuevas fuentes de fosfotriesterasas que fueron luego aplicadas a la hidrólisis de compuestos organofosforados como así también, en una primera aproximación, a la síntesis de fosfotriésteres de nucleósidos.

En este marco se han analizado las condiciones de reacción de 6 cepas bacterianas con actividad fosfotriesterasa, previamente seleccionadas en nuestro laboratorio, que permitieron encontrar condiciones para mejorar las actividades originalmente obtenidas. Por ejemplo, se consiguió incrementar significativamente la velocidad de hidrólisis de *Streptomyces setonii* ATCC 39116 (C35) y *Nocardia asteroides* ATCC 19296 (C49) a 50°C, alcanzándose así un aumento de 75 y 26 veces la actividad respecto de *Brevundimonas diminuta* (Bd). Otro resultado remarcable, considerando que la mayoría de las fosfotriesterasas muestran actividad a pHs básicos, es que *Streptomyces setonii* ATCC 39116 (C35) mostró 13 veces más actividad que el control a pH 6.

Si bien todas las cepas fueron capaces de degradar los distintos compuestos organofosforados (OPs) ensayados, se seleccionó para cada sustrato el microorganismo que llevaba a cabo más eficientemente la hidrólisis del mismo: *Streptomyces setonii* ATCC 39116 (C35) para metil paraoxón (MPO), *Nocardia asteroides* ATCC 19296 (C49) frente a paraoxón y coroxón, *Arthrobacter oxydans* ATCC 14359 (C64) frente a metil paratión, *Arthrobacter oxydans* ATCC 14358 (C55) frente a diclorvós y *Streptomyces phaeochromogenes* CCRC 10811 (C13) frente a clorpirifós.

Se identificaron y estudiaron también dos bacterias (del género *Pedobacter* y *Brevundimonas*) con actividad fosfotriesterasa aisladas previamente en nuestro laboratorio, provenientes de campos tratados con compuestos organofosforados de la provincia de Buenos Aires. El estudio de sus perfiles de actividad hidrolítica en diferentes condiciones de pH y temperatura, empleando como sustrato modelo metil paraoxón, permitió determinar que estos microorganismos presentaron mayor actividad a 60 °C por lo que serían potencialmente útiles para biorremediación en ambientes termófilos. Además mostraron actividad a pH 6 y 7, lo que los hace aptos para el tratamiento y decontaminación de ciertos alimentos. La optimización de las condiciones de reacción mostró que *Pedobacter* (Pd) y *Brevundimonas* sp. (Bsp) fueron 10 veces más activos frente a coroxón y cumafós que los microorganismos *wild type* en condiciones estándar. Estos resultados permiten concluir que el ambiente del cual es aislado un microorganismo es determinante en su capacidad catalítica, ya que los mejores resultados se observaron para OPs con sustituyentes voluminosos; en particular, clorpirifós, que es uno de los pesticidas con que estos suelos han sido tratados. Además, la temperatura de reacción elegida fue

30°C, coincidente también con la temperatura a la cual se encontraban dichos microorganismos en la naturaleza.

Con el fin de aplicar los resultados obtenidos en este trabajo a la biorremediación de aguas contaminadas con OPs, se inmovilizaron por atrapamiento en perlas de alginato de calcio tanto células enteras como extractos enzimáticos provenientes de los microorganismos bacterianos estudiados. Luego de un análisis de costos-beneficios se decidió seleccionar las células enteras inmovilizadas de *Nocardia asteroides* ATCC 19296 (C49) y *Pedobacter* (Pd) como los biocatalizadores inmovilizados más adecuados para ser usados para la degradación de paraoxón y clorpirifós respectivamente, en un reactor tubular de lecho empacado. Estos biocatalizadores fueron caracterizados en cuanto a su reutilización, observándose que en la degradación de paraoxón, el biocatalizador se pudo reutilizar hasta 3 veces, mientras que para clorpirifós tras 8 ciclos de reusos no se alcanzó un decaimiento mayor del 50% de su actividad original, por lo que se podría seguir utilizando. Por otra parte, el estudio de la distribución de los tiempos de residencia permitió concluir que el comportamiento del flujo era del tipo pistón, por lo que el recorrido del fluido en el espacio tubular es como un émbolo, siendo la dispersión axial despreciable.

El reactor diseñado en este trabajo fue capaz de degradar 0,15 mM de clorpirifós en 56 h; aunque en comparación con informes previos los rendimientos son inferiores. Es importante considerar que el biocatalizador empleado es *wild type* y que es posible reutilizarlo un número mayor de ciclos que otros sistemas ya informados. Por consiguiente, consideramos que los resultados aquí obtenidos son alentadores para explorar en un futuro el escalado del proceso.

Por otra parte, y con el fin de expandir el repertorio de OP hidrolasas disponibles, se evaluó la presencia de esta actividad en cuatro hongos seleccionados del cepario del Laboratorio de micología de los alimentos de la Universidad Nacional de Quilmes. Entre ellos, *Penicillium chrysogenum* fue el que exhibió mayor actividad hidrolítica, degradando el 92% de metil paraoxón a los 30 días de reacción. Es destacable que estos microorganismos fueron activos a pHs ácidos, que la enzima es extracelular, que la actividad OP hidrolasa de estos hongos no había sido reportada con anterioridad y que el extracto enzimático liofilizado, en líneas generales, mantuvo la actividad hidrolítica. Este último tipo de biocatalizador es una alternativa novedosa, estable y fácilmente utilizable. En perspectivas a futuro sería útil evaluar el extracto enzimático frente a diferentes OPs, a fin de determinar la especificidad por sustrato, que como bien ya hemos demostrado, puede ser sumamente variable de acuerdo a su estructura química.

Finalmente, hemos explorado el uso de las enzimas aquí estudiadas para la preparación de prodrogas nucleotídicas, lo que consideramos una alternativa muy beneficiosa comparada con las metodologías químicas utilizadas en la actualidad. Si bien en este trabajo se han ensayado temperaturas distintas y nuevas fuentes enzimáticas, no se han podido mejorar las bajas conversiones que se habían obtenido previamente en nuestro laboratorio. Los resultados preliminares obtenidos deben confirmarse con una estricta elucidación estructural del producto obtenido. Con perspectivas a futuro sería de interés sobreexpresar la enzima seleccionada y mediante ingeniería de proteínas, optimizar la aceptación de los sustratos nucleosídicos.

Durante el transcurso de este trabajo ha dado lugar a las siguientes publicaciones y participaciones en congresos:

PUBLICACIONES

123. Gudiño ED, **Santillan JY**, Iglesias LE, Iribarren AM. An enzymatic alternative for the synthesis of nucleoside 5-monophosphates. *Enzyme Microb Technol* 2018; **111**: 1–6.
124. **Santillan JY**, Dettorre LA, Lewkowicz ES, Iribarren AM. New and highly active microbial phosphotriesterase sources. *FEMS Microbiol Lett* 2016; **363**: doi: 10.1093/femsle/fnw276.

La publicación Santillan et al. Ha derivado en las siguientes citas y publicaciones de divulgación científica:

- **Bacterias las principales aliadas**, Web UNQ, reporte de acuerdo entrevista y lo publicado: *Santillan et al. FEMS Microbiol let (2016)*. <http://www.unq.edu.ar/noticias/2639-bacterias-las-principales-aliadas.php> Adolfo Iribarren Marzo 2017
- **Identifican bacterias contra plaguicidas**, Diario de Cuyo, reporte de acuerdo entrevista con Instituto Leloir y lo publicado: *Santillan et al. FEMS Microbiol let (2016)*. <https://www.diariodecuyo.com.ar/suplementos/Identifican-bacteriascontra-plaguicidas-20170203-0090.html> Febrero 2017.

- **Científicos argentinos trabajan con bacterias que degradan agrotóxicos**, Foro ambiental, reporte de acuerdo entrevista con Instituto Leloir y lo publicado: *Santillan et al. FEMS Microbiol let* (2016). <http://www.foroambiental.net/index.php/noticias-ambientales/cultura/1983-cientificos-argentinos-trabajan-conbacterias-que-degradan-agrotoxicos>. Febrero 2017.
- **Científicos argentinos identifican bacterias que degradan insecticidas tóxicos**, reporte de acuerdo entrevista con Instituto Leloir y lo publicado: *Santillan et al. FEMS Microbiol let* (2016). <http://www.agenciacyta.org.ar/2017/01/cientificos-argentinos-identifican-bacterias-que-degradan-insecticidas-toxicos/> Enero 2017.
- **Investigadores argentinos identificaron bacterias que degradan los insecticidas tóxicos**, Diario El Popular, reporte de acuerdo entrevista con Instituto Leloir y lo publicado: *Santillan et al. FEMS Microbiol let* (2016). <http://www.elpopular.com.ar/eimpresa/252265/investigadores-argentinos-identificaron-bacterias-que-degradan-losinsecticidas-toxicos> Enero 2017.
- **Hallan bacterias que permitirían tratar aguas y terrenos contaminados con organofosforados**, reporte de acuerdo entrevista con Instituto Leloir y lo publicado: *Santillan et al. FEMS Microbiol let* (2016). <http://www.sertox.com.ar/modules.php?name=News&file=article&sid=10833> Enero 2017.
- **Degradan insecticidas tóxicos**, Diario El Territorio y desarrollo, reporte de acuerdo entrevista con Instituto Leloir y lo publicado: *Santillan et al. FEMS Microbiol let* (2016). <http://diarioterritorioydesarrollo.blogspot.com.ar/2017/01/degradan-insecticidas-toxicos.html> Enero 2017.

CONGRESOS

Comunicación oral

- **“Inmovilización y diseño de reactor para tratamiento de aguas contaminadas con pesticidas organofosforados”**. Santillan Julia Y., Molina Melisa, Iribarren Adolfo. III Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones. 2018. San Luis, Argentina.

Póster

- **“Inmovilización de Fosfotriesterasas para la biorremediación de compuestos organofosforados”** Santillán Julia Y., Molina Melisa, Nóbile Matias, Lewkowicz

Elizabeth S., Iribarren Adolfo M. IV Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos (Saprobio). 2016. Buenos Aires, Argentina.

- **“Potenciales biocatalizadores aplicables a la biodegradación de pesticidas organofosforados”** Santillán Julia Y., Muzlera Andres, Lewkowicz Elizabeth S., Iribarren Adolfo M. II Simposio Latinoamericano de biocatálisis y biotransformaciones. 2016. Buenos Aires, Argentina.

- **“Aislamiento y estudio de la actividad hidrolítica de la fosfotriesterasa de *Aspergillus niger*”**. Santillán Julia Y., Muzlera Andrés, Lewkowicz Elizabeth S., Iribarren Adolfo M. X Simposio Red Bio 2015. San Miguel de Tucumán, Argentina.

- **“Hidrólisis del Metil paraoxón empleando como biocatalizador la fosfotriesterasa de *Aspergillus niger*”** Santillán Julia Y., Muzlera Andrés, Lewkowicz Elizabeth S., Iribarren Adolfo M. II Jornadas de Doctorandos y Estudiantes avanzados de CyT. 2015. Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Buenos Aires.

- **“Fosfotriesterasas bacterianas aplicadas a la degradación de compuestos organofosforados.”** Muzlera Andrés, Santillán Julia Y., Lewkowicz Elizabeth S., Iribarren Adolfo M. II Jornadas de Doctorandos y Estudiantes avanzados de CyT. 2015. Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Buenos Aires.

- **“Hidrólisis enzimática de fosfotriesteres”**. Santillán Julia Y., Muzlera Andrés, Lewkowicz Elizabeth S., Iribarren Adolfo M. XX Simposio Nacional de Química Orgánica. 2015. Mar del Plata, Buenos Aires.

- **“Improvement of bacterial fosfotriesterase activity”**. Santillán Julia Y., Muzlera Andrés, Lewkowicz Elizabeth S., Iribarren Adolfo M. XII Simposio Internacional de Biocatálisis y Biotransformaciones (BIOTRANS 2015). 2015. Viena, Austria.

- **“Fosfotriesterasas bacterianas aplicadas a la degradación de compuestos organofosforados”**. Santillán Julia Y., Muzlera Andrés, Lewkowicz Elizabeth S., Iribarren Adolfo M. III Simposio Argentino de Procesos Biotecnológicos. 2014, Santa Fe, Provincia de Santa Fe

- **“Biocatalyzed synthesis of nucleoside phosphates”**. Santillán Julia Y., Palazzolo Martin, Gudiño Esteban, Iglesias Luis, Lewkowicz Elizabeth S., Iribarren Adolfo M. XIX International round table on nucleosides, nucleotides and nucleic acids. 2014. Pozna, Polonia.

- **“Microbial bioremediation of organophosphorus compounds”**. Santillán Julia Y., Lewkowicz Elizabeth S., Iribarren Adolfo M. I Simposio Latinoamericano de Biocatálisis y Biotransformaciones. 2014 Buzios, Brasil.

- **“Degradación de compuestos organofosforados biocatalizada por fosfotriesterasas bacterianas”**. Santillán Julia Y., Dettorre Lucas, Lewkowicz Elizabeth S.,

Iribarren Adolfo M. XIX Simposio Nacional de Química Orgánica. 13. Mar del Plata, Buenos Aires.

- **“Biocatalyzed hydrolysis and transesterification of phosphotriesters. Synthesis of pronucleotides and identification of new phosphotriesterase activities”** Dettorre, Lucas A; Santillán, Julia Y ; Bertana Lahourcade, Julieta; Lewkowicz, Elizabeth S ; Iribarren, Adolfo M. XI Simposio Internacional de Biocatálisis y Biotransformaciones (BIOTRANS 2013). 2013. Manchester, Inglaterra.
- **“Búsqueda, selección y optimización de biocatalizadores”** Julieta Bertana Lahourcade, Paola Bianchi, Lucas Dettorre, Luis Iglesias, Adolfo Iribarren, Elizabeth Lewkowicz, Rosario Médici, Julia Santillán. I Jornadas de Doctorandos y Estudiantes avanzados de CyT. 2013. Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Buenos Aires.
- **“Preparación quimioenzimática y aplicaciones de nucleósidos, nucleótidos y sus análogos”** Julieta Bertana Lahourcade, Paola Bianchi, Lucas Dettorre, Esteban Gudiño, Luis Iglesias, Adolfo Iribarren, Elizabeth Lewkowicz, Rosario Médici, Matías Nóbile, Martín Palazzolo, María Belén Sabaini, Julia Santillán y Ana Laura Valino. I Jornadas de Doctorandos y Estudiantes avanzados de CyT. 2013. Universidad Nacional de Quilmes, Bernal, Buenos Aires.

ANEXO

ANEXO I

Composición medios de cultivo para crecimiento bacteriano

M1 maltosa 1% (Nutrient agar I + 1% maltosa)	
Extracto de carne	5g
Peptona ácida de caseína	10g
NaCl	5g
H ₂ O	1L
Medio 2 (Nutrient agar II)	
Extracto de carne	1g
Peptona ácida de caseína	5g
Extracto de levadura	2g
NaCl	5g
H ₂ O	1L
Medio 56 (YEME, Bennett's)	
Glucosa	4g
Extracto de malta	10g
Extracto de levadura	4g
H ₂ O	1L
Medio 118 (<i>Streptomyces</i> medium)	
Glucosa	4g
Extracto de malta	10g
Extracto de levadura	4g
CaCO ₃	2g
H ₂ O	1L

ANEXO II

Composición para medios de cultivo para crecimiento fúngico

MEA (Malt extract)	
Extracto de malta	20 g
Peptona ácida de caseína	1 g
Glucosa	20g
Agar	20 g
H ₂ O	1L
CYA (Czapek yeast extract)	
Extracto de levadura	5 g
Sacarosa	30 g
K ₂ HPO ₄	1 g
Czapek concentrado*	10 mL
Solución de metales traza**	1 mL
H ₂ O	1L
Czapek concentrado*	
NaNO ₃	30 g
KCl	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.1 g
H ₂ O	100 mL
Solución de metales traza**	
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.5 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1 g
H ₂ O	100 mL

CYAm	
Glucosa	10 g
Sacarosa	30 g
Czapek concentrado*	10 mL
Solución de metales traza**	1 mL
H ₂ O	1L
Czapek concentrado*	
NaNO ₃	20 g
KCl	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
H ₂ O	100 mL
Solución de metales traza**	
FeCl ₃	0.5 g
BaCl ₂	10 g
CaCl ₂	2.5 g
H ₂ O	100 mL

ANEXO III

Capítulo 7

- *Cromatogramas de patrones, reacción de transesterificación*

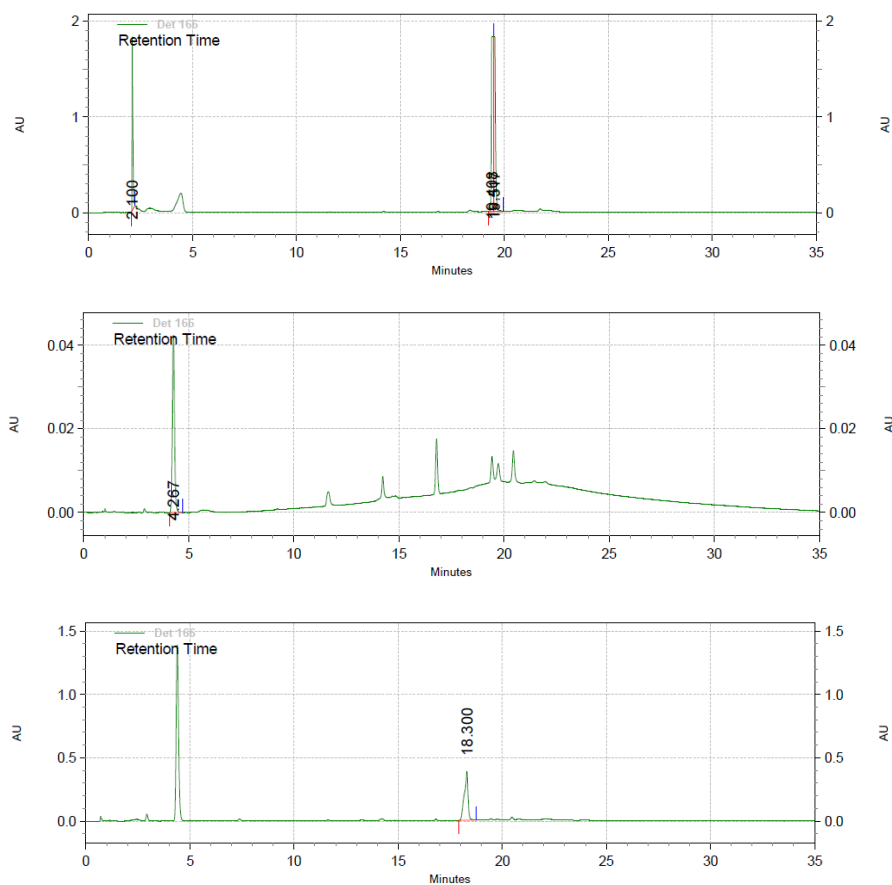


Figura 7.2. a) PNF, t_R 18,3 min. b) Inosina, t_R 4,3 min c) MPO, t_R 19,5 min.